

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-500618

(43)公表日 平成11年(1999)1月19日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09
A 61 K 48/00
C 12 N 1/21
5/10
// (C 12 N 1/21

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
A 61 K 48/00
C 12 N 1/21
5/00
A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-525455
(86) (22)出願日 平成8年(1996)2月21日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)8月22日
(86)国際出願番号 PCT/FR96/00274
(87)国際公開番号 WO96/26270
(87)国際公開日 平成8年(1996)8月29日
(31)優先権主張番号 95/02117
(32)優先日 1995年2月23日
(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 ロースープーラン・ロレ・エス・アーフランシス国、エフー-92160・アントニー、アブニユ・レイモン-アロン、20
(72)発明者 カムロン、ペアトリス
フランス国、エフー-75005・パリ、リュ・トゥルヌフォール、6
(72)発明者 クルゼ、ジヨエル
フランス国、エフー-92330・ゾー、リュ・ミシェル-ボワザン、12
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNA分子、その製造及び遺伝子治療における使用

(57)【要約】

本発明は、環状形態であり、実質的に1種以上の有用遺伝子を含むことを特徴とする二本鎖DNA分子に関する。

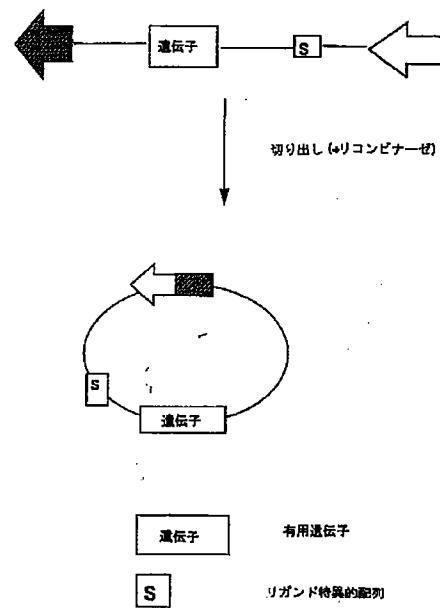


Figure 3

【特許請求の範囲】

1. 一環状で超らせん形態であり、
—哺乳動物細胞で活性な転写プロモーター及び転写ターミネーターの制御下の有
用遺伝子から構成される発現カセットを含んでおり、
—複製起点を欠失しており、
—マーカー遺伝子を欠失しており、
—2つの配列間の部位特異的組換えにより生成され、発現カセットの外側に配置
された領域を含む、ことを特徴とする二本鎖DNA分子。
 2. リガンドと特異的に相互作用することが可能な配列を更に含むことを特徴と
する請求項1に記載の分子。
 3. リガンドと特異的に相互作用することが可能な配列が、特定オリゴヌクレオ
チドとハイブリダイゼーションにより三重螺旋を形成することが可能な配列であ
ることを特徴とする請求項2に記載の分子。
 4. 三重螺旋を形成することが可能な配列が5～30塩基対を含むことを特徴と
する請求項3に記載の分子。
-
5. 三重螺旋を形成することが可能な配列がホモプリン-ホモピリミジン配列で
あることを特徴とする請求項3又は4に記載の分子。
 6. 2つのa t t結合配列間もしくはトランスポゾンのレゾルベースの2つの認
識配列間の部位特異的組換えにより生成される配列又はRK2のparAを含む
ことを特徴とする請求項1に記載の分子。
 7. マルチマーを分解することが可能なRK2の遺伝子座p a rに由来するmr
s配列を更に含むことを特徴とする請求項1から6のいずれか一項に記載の分子
。
 8. 有用遺伝子が治療、ワクチン、農学又は獣医学用物質をコードする核酸であ
ることを特徴とする請求項1から7のいずれか一項に記載の分子。
 9. 部位特異的組換えによりプラスミド又は染色体から切り出すことにより得ら
れることを特徴とする請求項1から8のいずれか一項に記載の分子。
 10. 哺乳動物細胞で活性な転写プロモーター及び転写ターミネーターの制御下

の有用遺伝子から構成され、順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする
2つの配列によってフラン

キングされた発現カセットを含む組換えDNA。

11. a) 複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
b) 順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列と、
c) 前記配列b) の間に配置され、哺乳動物細胞で活性な転写プロモーター及び
転写ターミネーターの制御下の有用遺伝子から構成される発現カセットを含む複
製プラスミドであることを特徴とする請求項13に記載の組換えDNA。

12. 部位特異的組換えを可能にする配列が、リコンビナーゼの存在下で特異的
組換えが可能な配列であることを特徴とする請求項10又は11に記載の組換え
DNA。

13. リコンビナーゼがλファージのインテグラーゼのファミリー及びトランス
ポゾンTn3のレゾルベasesのファミリーから選択されることを特徴とする請求
項12に記載の組換えDNA。

14. 部位特異的組換えを可能にする配列がバクテリオファージから誘導される
ことを特徴とする請求項10から13のいずれか一項に記載の組換えDNA。

15. 部位特異的組換えを可能にする配列がバクテリオファー

ジの結合配列a_l_t又は誘導配列から構成されることを特徴とする請求項14に
記載の組換えDNA。

16. 部位特異的組換えを可能にする配列がバクテリオファージλ、P22、Φ
80、P1、HP1又はプラスミドpSAM2もしくは2の結合配列又は誘導配
列から構成されることを特徴とする請求項15に記載の組換えDNA。

17. 部位特異的組換えを可能にする配列が配列番号1、2、6、7、8、9、
10、11、12、13又は14の配列の全部又は一部を含むことを特徴とする
請求項16に記載の組換えDNA。

18. (a) 複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
(b) 順方向に配置されたファージλ、P22、Φ80、P1、HP1又はプラ

スミド p S A M 2 もしくは 2 から選択されるバクテリオファージの a t t P 及び a t t B 配列と、

(c) 前記配列間に配置され、哺乳動物細胞で活性な転写プロモーター及び転写ターミネーターの制御下の有用遺伝子から構成される発現カセットを含むことを特徴とするプラスミド。

19. 部位特異的組換えを可能にする配列が λ バクテリオファージの結合配列から構成されることを特徴とする請求項 18 に

記載のプラスミド。

20. 部位特異的組換えを可能にする配列がバクテリオファージ P 1 から誘導されることを特徴とする請求項 14 に記載の組換え D N A。

21. (a) 細菌複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、

(b) 順方向に配置されたバクテリオファージの逆方向反復配列 (l o x P 領域) と、

(c) 前記配列 (b) の間に配置され、哺乳動物細胞で活性な転写プロモーター及び転写ターミネーターの制御下の有用遺伝子から構成される発現カセットを含むことを特徴とするプラスミド。

22. 部位特異的組換えを可能にする配列がトランスポゾンから誘導されることを特徴とする請求項 10 から 13 のいずれか一項に記載の組換え D N A。

23. 部位特異的組換えを可能にする配列がトランスポゾン T n 3、T n 2 1 もしくは T n 5 2 2 のリゾルベースの認識配列又は誘導配列から構成されることを特徴とする請求項 22 に記載の組換え D N A。

24. 部位特異的組換えを可能にする配列が配列番号 1 5 の配

列の全部又は一部を含むことを特徴とする請求項 23 に記載の組換え D N A。

25. 部位特異的組換えを可能にする配列がプラスミド R P 4 の p a r 領域から誘導されることを特徴とする請求項 10 から 13 のいずれか一項に記載の組換え D N A。

26. リガンドと特異的に相互作用することが可能な配列を更に含むことを特徴

とする請求項10から25のいずれか一項に記載の組換えDNA。

27. (a) 複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
 (b) 順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列と、
 (c) 前記配列b) の間に配置された1種以上の有用遺伝子及びリガンドと特異的に相互作用することが可能な配列を含むことを特徴とするプラスミド。

28. (a) 複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
 (b) 順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列と、
 (c) 前記配列b) の間に配置された1種以上の有用遺伝子及びマルチマーを分解することが可能なRK2の遺伝子座par

に由来するmrs配列を含むことを特徴とするプラスミド。

29. (a) 複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
 (b) 順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列と、
 (c) 前記配列b) の間に配置された1種以上の有用遺伝子、マルチマーを分解することが可能なRK2の遺伝子座parに由来するmrs配列及びリガンドと特異的に相互作用することが可能な配列を含むことを特徴とするプラスミド。

30. (a) 複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
 (b) 順方向に配置されたインテグラーゼ依存性部位特異的組換えを可能にする2つの配列及び該2つの配列の隣に同様に順方向に配置されたレゾルベース依存性部位特異的組換えを可能にする2つの配列と、
 (c) 前記配列b) の間に配置された1種以上の有用遺伝子及び場合によりリガンドと特異的に相互作用することが可能な配列を含むことを特徴とするプラスミド。

31. リガンドと特異的に相互作用することが可能な配列が請求項2から5のいずれか一項に記載の配列であることを特徴とする請求項27、29及び30のいずれか一項に記載のプラス

ミド。

32. 請求項14、27、29及び30のいずれか一項に記載のプラスミドを含

む組換え細胞。

3 3. 請求項 1 0 に記載の組換え D N A の 1 個以上のコピーをそのゲノムに挿入した組換え細胞。

3 4. 細菌であることを特徴とする請求項 3 2 又は 3 3 に記載の組換え細胞。

3 5. 真核細胞であることを特徴とする請求項 3 2 又は 3 3 に記載の組換え細胞。

3 6. 大腸菌 D 1 2 1 0 H P であることを特徴とする請求項 3 4 に記載の組換え細胞。

3 7. 請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種の D N A 分子を含む医薬組成物。

3 8. 請求項 1 0 に記載の組換え D N A を含む宿主細胞培養物を、部位特異的組換えをインビオ誘導することが可能なりコンビナーゼと接触させることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の D N A 分子の製造方法。

3 9. 宿主細胞培養物が請求項 3 2 に記載の細胞の培養物であることを特徴とする請求項 3 8 に記載の方法。

4 0. 宿主細胞培養物が請求項 3 3 に記載の細胞の培養物であることを特徴とする請求項 3 8 に記載の方法。

4 1. リコンビナーゼとの接触が、前記リコンビナーゼの遺伝子を含むプラスミド又はファージを培養細胞にトランスフェクト又は感染させることにより実施されることを特徴とする請求項 3 8 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

4 2. リコンビナーゼとの接触が、宿主細胞中に存在する前記リコンビナーゼをコードする遺伝子の発現を誘導することにより実施されることを特徴とする請求項 3 8 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

4 3. 宿主細胞が温度調節下に発現されるリコンビナーゼの遺伝子をそのゲノムに組み込んでおり、その培養物を誘導温度で培養することによりリコンビナーゼと接触させることを特徴とする請求項 4 2 に記載の方法。

4 4. 使用する宿主細胞が前記リコンビナーゼの遺伝子を含む溶原ファージをそのゲノムに組み込んでいることを特徴とする請求項 4 3 に記載の方法。

45. 部位特異的組換えをインビトロ誘導することが可能なりコンビナーゼと請求項11に記載のプラスミド調製物を接触さ

せることを特徴とする請求項1から9のいずれか一項に記載のDNA分子の製造方法。

46. ミニサークルの付加的精製段階を含むことを特徴とする請求項37又は45に記載の方法。

47. ミニサークルを含有する溶液を、場合により支持体にグラフトした特異的リガンドと接触させる段階を含むことを特徴とする請求項46に記載の方法。

48. ミニサークルを含有する溶液を、場合により支持体にグラフトし、ミニサークル中に存在する特定配列とハイブリダイゼーションにより三重螺旋を形成することが可能なオリゴヌクレオチドと接触させることを特徴とする請求項47に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

D N A 分子、その製造及び遺伝子治療における使用

遺伝子治療は患部細胞又は器官に遺伝情報を導入することにより欠陥又は異常を治療する方法である。この情報は器官から抽出した細胞にインビトロ導入後に生物に再導入してもよいし、標的組織に直接インビオ導入してもよい。D N Aは高分子量負電荷分子であるため、天然にはリン脂質細胞膜を通過し難い。そこで、遺伝子導入を可能にするために種々のベクターが使用されており、ウイルスベクターと、天然又は合成の化学及び／又は生化学ベクターに分けられる。ウイルスベクター（レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等）は特に膜通過には非常に有効であるが、病原性、組換え、複製、免疫原性等のいくつかの危険がある。化学及び／又は生化学ベクターはこれらの危険を避けることができる（詳細についてはBehr, 1993, CottenとWagner, 1993参考）。このようなベクターの1例は、D N Aと共に沈殿を形成することにより作用するカチオン（リン酸カルシウム、D E A E デキストラン等）であり、このような沈殿は細胞により「貧食」されると考えられる。D N Aを取り込み、形質

膜と融合するリポソームでもよい。合成遺伝子導入ベクターは一般にD N Aと結合して表面に正電荷をもつ粒子を形成するカチオン脂質又はポリマーである。これらの粒子は細胞膜の負電荷と相互作用した後、細胞膜を通過することができる。このようなベクターの例としては、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン（D O G S, T r a n s f e c t a m (登録商標)) 又はN-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル] -N, N, N-トリメチルアンモニウムクロライド（D O T M A, L i p o f e c t i n (登録商標)) を挙げることができる。D N Aを濃縮し、リガンドと結合したポリカチオン部分から構成されるキメラタンパク質も開発されており、前記リガンドは膜レセプターに結合してエンドサイトシスにより細胞内に複合体を運搬する。このように、導入した遺伝子のインビオ生体利用性を改善するために組織又は所定の細胞集団を「ターゲティング」することが理論的には可能である。

しかし、化学及び／又は生化学ベクター又は裸のDNAを使用すると、薬理学的純度のDNAが多量に產生される可能性がある。実際に、これらの遺伝子治療技術では医薬は同一DNAにより構成されるので、ヒト治療用に適した性質をもつ過量の

DNAを製造できることが不可欠である。

遺伝子治療で現在使用されているプラスミドは、(i)複製起点と、(ii)抗生物質（カナマイシン、アンピシリン等）耐性遺伝子等のマーカー遺伝子と、(iii)その発現に必要な配列（エンハンサー、プロモーター、ポリアデニル化配列等）をもつ1種以上のトランスジーンをもつ。しかし、(Nabell, 1992)に記載されているようなメラノーマの治療等の臨床試験レベル又は実験レベルで）遺伝子治療に現在使用されているこれらのプラスミドは、特に生体内伝播に関連するいくつかの欠点がある。例えば、この伝播の結果、生体中に存在するコンピテント細菌はこのプラスミドを低頻度でしか受容できない。そのため、インビオ遺伝子治療でDNAが患者の生体内で伝播してこの患者に感染する細菌又は共生フロラの細菌と接触する可能性は一層高くなる。プラスミドの受容細菌が大腸菌等の腸内細菌である場合には、このプラスミドは複製することができる。その結果、治療遺伝子の伝播が生じる。遺伝子治療で使用される治療遺伝子が例えはリンホカイン、成長因子、抗腫瘍遺伝子、又は宿主に欠損しているためにその遺伝子欠陥を治療することが可能な機能をもつタンパク質をコードし得る

限り、これらの遺伝子の一部の伝播は（例えは病原細菌がヒト成長因子の遺伝子を獲得するような場合に）予測不能な気掛かりな結果を生じる恐れがある。更に、非ウイルス遺伝子治療で使用されているプラスミドは抗生物質（アンピシリン、カナマイシン等）耐性マーカーももつ。従って、プラスミドの耐性遺伝子を選択する抗生物質と同一ファミリーの抗生物質を使用する全抗生素療法は該当プラスミドを選択することになるので、このようなプラスミドを獲得する細菌は明らかに優先的に選択される。因に、アンピシリンは世界で最も広く使用されている抗生素質ファミリーであるβ-ラクタムに属する。従って、治療遺伝子と耐性遺

伝子の伝播を最大限に制限するように努めることが必要である。更に、プラスミドがプラスミドのベクター部分に対応する遺伝子（複製に必要な機能、耐性遺伝子）をもつ場合には、これらの遺伝子がトランスフェクトした細胞で発現される危険もある。実際に、プラスミド上の宿主の発現シグナルに起因する除去不能な転写バックグラウンドが存在する。外来タンパク質は潜在的に免疫原性であり、従って、トランスフェクトした細胞の免疫系により攻撃されるので、その発現は所定数の遺伝子治療で全く有害である。

従って、治療用に適した遺伝子純度をもつ医薬DNA分子入手できることが特に重要である。これらのDNA分子を医薬用途に適した量で製造可能な方法を実現できることも特に重要である。本発明はこれらの問題を解決する。

実際に、本発明は遺伝子治療で利用可能であり、非常に改善された遺伝子純度と高い生体利用性をもつDNA分子に関する。本発明はこれらの分子の製造及び精製に特に有効な方法にも関する。

本発明は特に、遺伝子治療で利用可能であり、任意の非治療領域を実質的に欠失するDNA分子の開発にある。本発明によるDNA分子は環状構造で小サイズの超らせん状であることからミニサークルとも呼ばれ、多数の利点がある。

本発明によるDNA分子はまず第1に、（1）治療遺伝子の無制御な過剰発現を誘導し得る複製及び伝播（dissemination）、（2）耐性遺伝子の伝播及び発現、（3）プラスミドの非治療部分に存在する潜在的に免疫原性及び／又は炎症性の遺伝子の発現等のプラスミドの伝播に結びつけられる危険を回避できる。本発明によるDNA分子に含まれる遺伝情報は（複製起点や、抗生物質耐性遺伝子等を含まず）実際に治療遺伝子とその発現

調節シグナルに実質的に限られる。これらの分子（従ってこれらの分子に含まれる遺伝情報）が微生物移入され、安定に維持される可能性はほぼゼロである。

更に、本発明によるDNA分子はサイズが小さいため、潜在的に良好なインビオ生体利用性をもつ。特に、改善された細胞侵入および細胞分布の能力をもつ。因に、組織内の拡散係数は分子量に反比例すると認められている（Jain, 1

987）。また、細胞レベルでは高分子量分子は細胞膜を透過しにくい。更に、高分子量はプラスミドの発現に不可欠な核への移動にも適さず、核膜孔は核拡散に寸法制限を加える（Landfordら, 1986）。本発明によるプラスミドは非治療部分（特に複製起点と耐性遺伝子）を欠失するため、DNA分子のサイズを低減することもできる。例えば複製起点と耐性マーカー（ベクター部分）が3 kb、トランスジーンとその発現に必要な配列が3 kbとするならば、この低減は2分の1と予想することができる。（i）分子量と（ii）負電荷のこの低下により、本発明の分子は改善された拡散能と組織、細胞及び核生体利用性をもつ。

従って、本発明の第1の目的は、環状であり、本質的に1種以上の有用遺伝子を含むことを特徴とする2本鎖DNA分子に

ある。上述のように、本発明の分子は非治療領域、特に複製起点及び／又はマーカー遺伝子を実質的に欠失する。更に、本発明の分子は超らせん状であるという利点がある。

本発明は、これらの治療用DNA分子の製造に特に有効な方法、構築物及び特定細胞宿主の開発にもある。より詳細には、本発明による方法は部位特異的組換えによりプラスミド又は染色体から切り出すことにより上記治療用DNA分子を製造することを特徴とする。本発明による方法は、プラスミドの予備精製段階が不要であり、非常に特異的であり、特別に有効であり、DNA生産量が低下せず、非常に高い遺伝子純度と高い生体利用性の治療用分子が直接得られるという点で特に有利である。この方法は実際に、主に有用遺伝子と、発現が所望される細胞、組織、臓器、器官又は完全生物で前記遺伝子の発現を可能にする調節配列を含む環状DNA分子（ミニサークル）を生成する。更に、その後、これらの分子を慣用技術により精製してもよい。

部位特異的組換えは、配列間の部位特異的組換えを引き起こす種々の系により実施することができる。より好ましくは、本発明の方法における部位特異的組換えは、一般にリコンビナーゼと呼ばれる特定タンパク質の存在下で相互に組換え可能な2

種の特定配列により得られる。このため、本発明によるD N A分子は一般にこの部位特異的組換えにより生じる配列も含む。本発明の範囲内で使用される組換えを可能にする配列は一般に5～100塩基対、より好ましくは50塩基対未満を含む。

部位特異的組換えはインビボ（即ち宿主細胞内）で実施してもインビトロ（即ちプラスミド調製物上）で実施してもよい。

この点で、本発明は上記治療用D N A分子の製造に適した特定遺伝子構築物も提供する。これらの遺伝子構築物即ち本発明による組換えD N Aは特に、順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列によってランキングされた1種以上の有用遺伝子を含む。順方向位置とは、2つの配列が本発明による組換えD N A内で同一の5' - 3' 極性に従うことを意味する。本発明の遺伝子構築物は主に上記要素から構成される2本鎖D N Aフラグメント（カセット）であり得る。これらのカセットはこれらの要素をそのゲノムに組み込んだ細胞宿主の構築に利用できる（図1）。本発明の遺伝子構築物はプラスミドでもよく、即ち所与の宿主細胞で複製することができ、順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列によってランキングされた1種以上の有用遺伝子を含む任意の

直鎖又は環状D N A分子でもよい。これらのプラスミドはより具体的には、ベクター（例えはクローニング及び／又は発現ベクター）、ファージ、ウイルス等であり得る。本発明のこれらのプラスミドは、プラスミドの複製とその後のミニサークルの切り出しによってミニサークルを製造する目的で任意のコンピテント細胞宿主を形質転換させるために利用することができる（図2）。

この点で、本発明の別の目的は順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列によってランキングされた1種以上の目的遺伝子を含む組換えD N Aにある。

本発明による組換えD N Aは好ましくは少なくとも

- a) 複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
- b) 順方向に配置された部位特異的組換えを可能にする2つの配列と、

c) 前記配列b) の間に配置された1種以上の有用遺伝子と、を含むプラスミドである。

本発明による遺伝子構築物に存在する特定組換え系は、種々の起源のものでよい。特に、使用する特定配列及びリコンビナーゼは、種々の構造クラスに属するものを利用でき、特にバクテリオファージλのインテグラーゼのファミリー又はトランス

ポゾンTn3のリゾルベースのファミリーに属するものを利用できる。

バクテリオファージλのインテグラーゼのファミリーに属するリコンビナーゼのうちでは、特にファージλ (Landyら, Science 197 (1977) 1147)、P22及びΦ80 (Leongら, J. Biol. Chem. 260 (1985) 4468) のインテグラーゼ、Haemophilus influenzaeのHP1 (Hauserら, J. Biol. Chem. 267 (1992) 6859)、ファージP1のインテグラーゼCre、プラスミドpSAM2のインテグラーゼ (EP350341)、又はプラスミド2μのリコンビナーゼFLPを挙げることができる。本発明によるDNA分子がバクテリオファージλのインテグラーゼのファミリーの部位特異系を介して組換えにより製造される場合には、本発明によるDNA分子は一般に、対応するバクテリオファージ又はプラスミドの2つの結合配列a_t_t間の組換えにより生じる配列も含む。

トランスポゾンTn3のファミリーに属するリコンビナーゼのうちでは、特にトランスポゾンTn3もしくはトランスポゾ

ンTn21及びTn522のリゾルベース (Starckら, 1992)、バクテリオファージMuのインペルターゼGin又はプラスミドのリゾルベース、例えばRP4のp_arフラグメントのリゾルベース (Abe et al., Mol. Microbiol. 12 (1994) 131) を挙げができる。本発明によるDNA分子がトランスポゾンTn3のファミリーの部位特異系を介して組換えにより製造される場合には、本発明によるDNA分子は一般に、該当するトランス

ポゾンのリゾルベースの2つの認識配列間の組換えにより生じる配列も含む。

特定様によると、本発明の遺伝子構築物において、部位特異的組換えを可能にする配列はバクテリオファージから誘導される。より好ましくは、このような配列はバクテリオファージの結合配列（a t t P及びa t t B配列）又は誘導配列である。これらの配列は、インテグラーゼと呼ばれるリコンビナーゼの存在下で相互に特異的に組換え可能である。誘導配列なる用語は、バクテリオファージの結合配列の改変により得られ、適当なリコンビナーゼの存在下で特異的組換え能力を維持する配列を意味する。そのような配列は、例えば、該結合配列の短縮フラグメントでもよいし、逆に他の配列（制限部位等）を附加し

て伸長したフラグメントでもよい。更には、突然変異、特に点突然変異により得られる変異体でもよい。本発明によると、バクテリオファージ又はプラスミドのa t t P及びa t t B配列とは、該バクテリオファージ又はプラスミドに特異的な組換え系の配列のことであり、即ちa t t P配列は前記ファージ又はプラスミドに存在する配列であり、a t t Bは対応する染色体配列である。

好ましい例として、特にファージλ、P22、Φ80、P1、H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a eのHP1又はプラスミドpSAM2もしくは2μの結合配列を挙げることができる。これらの配列は配列番号1、2、6、7、8、9、10、11、12、13及び14の配列の全部又は一部から選択すると有利である。これらの配列は特に、これらのファージの結合配列の中心相同領域を含む。

この点で、本発明による好ましいプラスミドは、

- (a) 細菌複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
- (b) ファージλ、P22、Φ80、HP1、P1又はプラスミドpSAM2もしくは2μから選択されるバクテリオファージのa t t P及びa t t B配列又は誘導配列と、
- (c) 前記配列b) の間に配置された1種以上の有用遺伝子を

含む。

特に好ましい態様によると、 λ ファージの結合配列 (a t t P及びa t t B) を含む。これらの配列をもつプラスミドは特にプラスミド p X L 2 6 4 8、p X L 2 6 4 9又はp X L 2 6 5 0である。これらのプラスミドをインビボ又はインビトロで λ ファージのインテグラーゼの存在下におくと、配列が相互に組換えられ、切り出しにより、主に要素 (c) 即ち治療部分を含む本発明によるミニサークルがインビボ又はインビトロで生成される（図2）。

更に本発明の特定態様によると、部位特異的組換えを可能にする配列はファージ P 1 の l o x P 領域から誘導される。この領域は、Cre と呼ばれるタンパク質の存在下で相互に特異的に組換え可能な 2 つの逆方向反復配列から主に構成される (Sternbergら, J. Mol. Biol. 150 (1971) 467)。従って、特定変形例によると本発明は、(a) 細菌複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、(b) バクテリオファージ P 1 の逆方向反復配列 (l o x P 領域) と、(c) 前記配列 b) の間に配置された 1 種以上の有用遺伝子を含むプラスミドに関する。

別の特定態様によると、本発明の遺伝子構築物において、部位特異的組換えを可能にする配列はトランスポゾンから誘導される。より好ましくは、このような配列はトランスポゾンのリゾルベasesの認識配列又は誘導配列である。好ましい例としては、トランスポゾン T n 3、T n 21 及び T n 522 の認識配列を特に挙げることができる。好ましい例としては、配列番号 15 の配列又はその誘導体を挙げができる (Sherratt, P. 163-184, Mobile DNA, D. Berg と M. Howe 編, American Society for Microbiology, Washington D. C. 1989 も参照のこと)。

特に有利な別の変形例によると、本発明のプラスミドはマルチマーの分解配列も含む。このような配列は、好ましくはプラスミド R K 2 の m r s (マルチマー分解系) 配列である。より好ましくは、本発明は、
 (a) 細菌複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
 (b) ファージ λ 、P 2 2、 Φ 8 0、H P 1、P 1 又はプラスミド p S A M 2 も

しくは 2μ から選択されるバクテリオファージの順方向a_t_t_P及びa_t_t_B配列又は誘導配列と、

(c) 前記配列b) の間に配置された1種以上の有用遺伝子及びプラスミドR K 2のm r s配列を含むプラスミドに関する。

この様態は特に有利である。因にプラスミドp X L 2 6 4 9又はp X L 2 6 5 0をインビボでバクテリオファージのインテグラーゼの存在下におくと、配列が組換えられ、ミニサークルとミニプラスミドのみならず、ミニサークル又はミニプラスミドのマルチマー又はトポロジー形態も生成される。ミニサークルの生産を増加し、その精製を容易にするためには、これらの形態の濃度を低下できることが特に有利である。

プラスミドのマルチマー形態は当業者に公知である。例えばC o l E 1のc_e_rフラグメント(S ummer sら, 1984 Cell 36 p 1097)又はR K 2の遺伝子座p_a_rのm r s部位(L. E bert 1994 Mol. Microbiol. 2 p 131)はプラスミドのマルチマーの分解が可能であり、プラスミドの安定性の増加を助長する。但し、c_e_r部位での分解には大腸菌のゲノムによりコードされる4種のタンパク質が必要であるが(C o l I o m sら, 1990 J. Bacteriol. 172 p 6973)、m r s部位での分解にはR K 2の遺伝子座p_a_rにマッピングされる遺

伝子p_a_r_Aをコードするタンパク質P a r Aしか必要としない。このため、p_a_r_Aとm r s配列を含む遺伝子座p_a_rの全部又は一部を利用すれば有利であると思われる。例えば、m r s配列をλファージのa_t_t_B及びa_t_t_P配列間に配置すると、遺伝子p_a_r_Aをその固有のプロモーター又は誘導プロモーターからトランス又はシス発現させることができる。この点で、本発明の特定プラスミドは、

- (a) 細菌複製起点及び場合によりマーカー遺伝子と、
- (b) ファージλ、P 2 2、Φ 8 0、H P 1、P 1又はプラスミドp S A M 2もしくは 2μ から選択されるバクテリオファージの順方向a_t_t_P及びa_t_t_B配

列又は誘導配列と、

(c) 前記配列 b) の間に配置された 1 種以上の有用遺伝子及びプラスミド R K

2 の m r s 配列と、

(d) プラスミド R K 2 の遺伝子 p a r A を含む。

このようなプラスミドの 1 例は特に実施例に記載するプラスミド p X L 2 9 6

0 である。このようなプラスミドを利用して固有のモノマー形態のミニサークル

を生産することができる。

別の有利な変形例によると、本発明のプラスミドは異なるファミリーの 2 組の
部位特異的組換え配列を含む。このような配

列は、第 1 組のインテグラーゼ依存性配列と、第 2 組の p a r A 依存性配列が有
利である。2 組の配列を使用すると、最初の部位特異的組換えが不完全である場
合にミニサークルの生産収率を増加することができる。因にプラスミド p X L 2
6 5 0 又は p X L 2 9 6 0 をインビボでバクテリオファージのインテグラーゼの
存在下におくと、配列が組換えられ、ミニプラスミドとミニサークルが生産され
るが、この反応は完全ではない（初期プラスミドの 5～10 % が残存し得る）。

λ ファージの a t t 配列の各々の近傍に R K 2 の m r s 配列を導入すると、ミニ
サークルの生産を増加することができる。例えば λ ファージのインテグラーゼの
誘導と I n t 依存性組換え後、非組換え分子は R K 2 のタンパク質 P a r A の調
節下に m r s 部位で組換え可能になる。他方、タンパク質 P a r A の誘導と P a
r A 依存性組換え後に非組換え分子は λ ファージのインテグラーゼの調節下に a
t t 部位で組換え可能になる。従って、このような構築物はミニサークルとごく
少量の非組換え分子を生産することができる。a t t 配列と m r s 配列は共に順
方向であり、i n t 及び p a r A 遺伝子は同一誘導プロモーター又は 2 つの誘導
プロモーターから同時又は順次誘導され得る。 λ ファージ

の順方向結合配列 a t t B 及び a t t P と R K 2 の 2 つの順方向 m r s 配列を使
用するのが好ましい。

上述のように、本発明の別の態様は部位特異的組換えによりプラスミド又は染

色体から切り出すことにより上記治療用DNA分子を製造する方法にある。

従って、本発明の別の目的は上記のような組換えDNAを含む宿主細胞培養物を、部位特異的組換えを誘導することが可能なリコンビナーゼと接触させることを特徴とする、上記DNA分子（ミニサークル）の製造方法にある。前記リコンビナーゼの遺伝子を含むプラスミド又はファージをトランスフェクト又は感染させるか、あるいは宿主細胞中に存在する前記リコンビナーゼをコードする遺伝子の発現を誘導することにより接触させるとより好ましい。後述するように、この遺伝子はゲノムに組み込まれた形態で宿主細胞中に存在してもよいし、複製プラスミド又は本発明のプラスミド上の非治療部分に存在してもよい。

インビオ部位特異的組換えにより本発明によるミニサークルを生産できるようには、使用するリコンビナーゼを所定の時点で細胞又は培地に導入又は誘導しなければならない。こ

のためには種々の方法を利用することができる。第1の方法によると、調節下にその発現を可能にする形態でリコンビナーゼの遺伝子を含む宿主細胞を使用する。前記遺伝子は特にプロモーターもしくは誘導プロモーター系の制御下におくか、又は感熱系に導入する。特に、増殖期は潜伏しており、適当な温度で誘導される温度感受性ファージに遺伝子を導入する（例えば溶原λファージX_is⁻c_I 857）。リコンビナーゼの遺伝子の発現カセットはプラスミド、ファージ又は本発明のプラスミドの非治療領域に担持させることができる。前記カセットは宿主細胞のゲノムに組み込んでもよいし、複製形態のままでもよい。別の方によると、増殖期後に細胞培養物にトランスフェクト又は感染させるために使用するプラスミド又はファージに遺伝子の発現カセットを担持させる。この場合には、遺伝子を調節下に発現可能な形態にする必要はない。特に、任意の構成プロモーターを使用することができる。リコンビナーゼとの接触は、タンパク質と共に直接インキュベートすることにより、プラスミド調製物上でインビオ実施することもできる。

本発明の範囲内では、リコンビナーゼの遺伝子を調節下に発現させることができ宿主細胞を使用するのが好ましい。この

態様は、リコンビナーゼが誘導後に宿主細胞により直接供給されるので特に有利である。実際に、部位特異的インピボ組換えとその結果として本発明のミニサークルの切り出しを誘導するためには、所望の時点で培養細胞をリコンビナーゼの遺伝子の発現条件（温度感受性遺伝子の許容温度、調節プロモーターのインデューサーの付加等）下におくだけで十分である。更に、リコンビナーゼの遺伝子を導入するためにトランスフェクション又は感染が必要な場合には必ずしもそうでないとしても、この切り出しは全培養細胞がリコンビナーゼを発現するので特に高い効率で実施される。

第1の態様によると、本発明の方法はプラスミドから部位特異的組換えにより治療用DNA分子を切り出すことを特徴とする。この態様は上記プラスミドを利用して選択した宿主でまず最初に複製を行った後、第2段階で部位特異的組換えにより前記プラスミドの非治療部分（特に複製起点と耐性遺伝子）を切り出して本発明の環状DNA分子を生成する。この方法を実施するためには、種々の型のプラスミドを利用することができ、特にベクター、ファージ又はウイルスを利用できる。複製ベクターを利用するのが好ましい。

本発明の方法は、上記のようなプラスミドで宿主細胞を形質転換させた後、適量のプラスミドが得られるように形質転換細胞を培養する予備段階を含むと有利である。その後、上記条件下でリコンビナーゼと接触させることにより、部位特異的組換えによる切り出しを行う（図2）。上述のように、この態様では部位特異的組換えはインピボ（即ち宿主細胞内）でもインピトロ（即ちプラスミド調製物上）でも実施できる。

従って、好ましい態様によると、本発明のDNA分子は特に複製起点とマーカー遺伝子をもつ非治療部分を部位特異的組換えにより切り出すことにより、複製ベクターから得られる。

別の態様によると、本発明の方法は部位特異的組換えにより細胞宿主のゲノムからDNA分子を切り出すことを特徴とする。この態様はより詳細には、組換えを可能にする配列によってフランкиングされた有用遺伝子を含むカセットの1個以上のコピーをそのゲノムに挿入した細胞宿主の構築にある（図1）。宿主細胞

のゲノムに本発明のカセットを挿入するためには種々の技術を利用することができる。特に、組み込みベクターを利用することにより、ゲノムの複数の異なる場所に挿入できる。この点では、ミニMu系や例えばTn10の誘導体等の欠損ト

ラ

ンスポゾン等の種々の転位系を使用することができる (Klecknerら, Methods Enzymol. 204 (1991) 139; Groisman E., Methods Enzymol. 204 (1991) 180)。1種以上の有用遺伝子にランキングする2つの順方向組換え配列を含むカセットを細菌ゲノムに組み込むことが可能な相同組換えにより挿入を実施することもできる。この方法は細胞1個当たりできるだけ多数のコピーが得られるように所望回数反復することができる。別の方法としては、カセットの1コピーから最大限の数に増加するように、Labarréら (Labarre J., O. Reye s, Guyonvarch及びG. Leblon. 1993. Gene replacement, integration, and amplification at the gdhA locus of Corynebacterium glutamicum. J. Bacteriol. 175: 1001-107) に記載されているような組換えを利用するインビボ增幅系を使用してもよい。

好ましい方法の1例はミニMuの使用である。このためには、耐性マーカーと、転位に必要なシス機能と、有用遺伝子にフ

ランキングする2つの順方向組換え配列を含むカセットを含むミニMuの誘導体を構築する。ゲノムあたり複数のコピーを選択できる耐性マーカー（例えばカナマイシン）を使用することにより、これらのミニMuをゲノムの複数の場所に配置すると有利である (Groisman E. 前出)。上述のように、問題の宿主細胞は順方向組換え配列によってランキングされたフラグメントの切り出しを誘導する特定部位リコンビナーゼも誘導的に発現できる。切り出し後、ミニサークルを慣用技術により精製してもよい。

本発明の方法のこの態様は、単一型のプラスミド分子として本発明のミニサークルを生産できるので特に有利である。細胞は実際に、プラスミドから生産する場合のように他のエピソームプラスミドを全く含まない(図1及び2)。

本発明の別の目的は、上記のような組換えDNAの1個以上のコピーをそのゲノムに挿入した改変宿主細胞でもある。

本発明は更に、上記のようなプラスミドを含む任意の組換え細胞にも関する。これらの細胞は、所与の細胞にDNAを導入することが可能な当業者に公知の任意の技術により得られる。このような技術としては特に、形質転換、エレクトロポレーション、接合、プロトプラスト融合又は当業者に公知の他の任意

の技術が挙げられる。形質転換については、種々のプロトコールが従来技術に記載されている。特に、細胞の形質転換はItōら(J. Bacteriol. 153(1983) 163-168)に記載の技術に従って酢酸リチウムとポリエチレン glycol の存在下又はDurrenseら(Curr. Genet. 18(1990) 7)の技術に従ってエチレン glycol とジメチルスルホキシドの存在下で完全細胞を処理することにより実施できる。ヨーロッパ特許出願第EP 361991号にも代替プロトコールが記載されている。エレクトロポレーションについては、BeckerとGuarentte(in: Methods in Enzymology Vol 194(1991) 182)に従って実施することができる。

本発明による方法は任意の型の細胞宿主で実施することができる。特に、細菌又は真核細胞(酵母、動物細胞、植物細胞)等を利用できる。細菌のうちでより好ましいものとして、大腸菌、枯草菌、ストレプトミセス、シュードモナス(P. putida、P. aeruginosa)、Rhizonium meliloti、Agrobacterium tumefaciens、Staphylococcus aureus、S.

Treptomyces pristinaespiralis、Enterococcus faecium又はClostridium等を挙げることがで

きる。細菌のうちでは大腸菌を使用するのが好ましい。酵母のうちでは、Kluyveromyces、Saccharomyces、Pichia、Hansenula等を挙げることができる。哺乳動物細胞のうちではCHO、COS、NIH 3T3細胞等を挙げができる。

本発明によるプラスミドは、使用する宿主に応じてその複製を可能とするよう当業者により適応される。特に、複製起点とマーカー遺伝子は選択する宿主細胞に応じて選択される。

マーカー遺伝子は特に抗生物質（アンピシリン、カナマイシン、ゲネチシン、ハイグロマイシン等）に対して耐性の遺伝子でもよいし、細胞が欠損する機能（例えば染色体で欠失しているか不活性にされている遺伝子）を細胞に与え、プラスミド上でこの機能を回復する任意の遺伝子でもよい。

特定態様では、本発明の方法はミニサークルの付加的精製段階を含む。

この点では、ミニサークルはプラスミドDNAと同様に超らせん状であるので、プラスミドDNAの慣用精製技術により精製することができる。

これらの技術としては特に、臭化エチジウムの存在下の塩化セシウム密度勾配上の精製や、アニオン交換カラムの使用が挙げられる（Mariantisら, 1989）。更に、非治療部分（特に複製起点と選択マーカー）に対応するプラスミドDNAが非常に多量に存在すると予想される場合には、プラスミドを消化し且つミニサークルを消化しない1種以上の制限酵素を精製後又は前に使用することも可能であり、こうすると、臭化エチジウムの存在下の塩化セシウム密度勾配等のように直鎖DNAから超らせんDNAを分離する技術によって分離することができる（Mariantisら, 1989）。

更に、本発明は改善されたミニサークルの精製方法にも関する。この方法は、1段階で非常に高純度のミニサークルが高収率で得られる。この改善方法は、ミニサークル上に存在する2本鎖配列と特異的リガンドの相互作用に基づく。リガンドは種々のものを利用でき、特にタンパク種、化学種又は核酸種を利用できる。核酸型リガンドが好ましく、特に場合により化学的に修飾され、本発明のDNA分子上に存在する特定配列とハイ

ブリダイゼーションにより三重螺旋を形成することが可能なオリゴヌクレオチドが好ましい。実際に、所定のオリゴヌクレオチドは2本鎖DNA配列と特異的に三重螺旋を形成できることが立証されている（Heleneら、Biophys. Acta 1049 (1990) 99；参考資料として本明細書の一部とする仏国特許出願第FR94 15162号も参照）。

従って、特に有利な変形例では、本発明のDNA分子はリガンドと特異的に相互作用することが可能な配列も含む（図3）。このような配列は、ハイブリダイゼーションにより特定オリゴヌクレオチドと三重螺旋を形成することが可能な配列が好ましい。この配列は有用遺伝子の機能に影響しないので、本発明のDNA分子の任意の部位に配置することができる。この配列は本発明の遺伝子構築物（プラスミド、カセット）の有用遺伝子を含む部分にも存在する（特にプラスミドpXL2650参照）。本発明のDNA分子上に存在するこの特定配列は5～30塩基対を含むことが好ましい。

本発明による方法を実施するために使用されるオリゴヌクレオチドは下記塩基を含み得る。

—2本鎖DNAのダブルレットA. Tとトリプレットを形成することが可能なチミジン（T）（Rajagopalら、Biophys 28 (1989) 7859）；

—2本鎖DNAのダブルレットA. Tとトリプレットを形成することが可能なアデニン（A）；

—2本鎖DNAのダブルレットG. Cとトリプレットを形成することが可能なグアニン（G）；

—2本鎖DNAのダブルレットG. Cとトリプレットを形成することが可能なプロトン化シトシン（C+）（Rajagopalら、前出）。

好ましくは、使用するオリゴヌクレオチドはシトシンを含むホモピリミジン配列を含み、DNA分子上に存在する特定配列はホモプリンーホモピリミジン配列である。シトシンの存在により、シトシンがプロトン化されている場合には酸性pHで安定な三重螺旋が得られ、シトシンが中和されている場合にはアルカリ性

pHで不安定な三重螺旋が得られる。

ハイブリダイゼーションにより三重螺旋を形成できるようにするために、オリゴヌクレオチドと本発明のDNA分子上に存在する特定配列が相補的であることが重要である。この点で、

最良の収率と最良の選択性を得るために、本発明の方法では完全に相補的なオリゴヌクレオチドと特定配列を使用する。特に、オリゴヌクレオチドポリーカタニンと特定配列ポリーカアノニンを使用できる。例えば、塩基GAGGが三重螺旋を形成せずにオリゴヌクレオチドを結合アームから分離することができる配列GAGGCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT（配列番号5）のオリゴヌクレオチドを挙げることができる。

当然のことながら、親和性をさほど低下させない程度であれば多少のミスマッチは許容できる。使用するオリゴヌクレオチドは天然種（修飾されていない天然塩基から構成）でもよいし、化学的に修飾してもよい。特に、オリゴヌクレオチドはヌクレアーゼに対する耐性もしくは保護又は特定配列に対する親和性を増加できるように所定の化学的修飾を含むと有利である。

例えば、骨格構造の修飾（例えばメチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート等）によりオリゴヌクレオチドをヌクレアーゼに対してより耐性にすることができる。オリゴヌクレオチドと特定配列の間の相互作用及び／又は親和性を改善することを特に目的とした別の型の修飾も考えられる。特に、本発明で完全に有利な修飾はオリ

ゴヌクレオチドのシトシンのメチル化である。こうしてメチル化されたオリゴヌクレオチドは中性pHで特定配列と安定な三重螺旋を形成する特筆すべき性質をもつ。従って、従来技術のオリゴヌクレオチドよりも高いpH、即ちプラスミドDNAの分解の危険が少ないpHで操作することができる。

本発明の方法で使用するオリゴヌクレオチドの長さは少なくとも3、好みしくは5～30塩基である。10塩基を越える長さのオリゴヌクレオチドを使用すると有利である。長さは所望の相互作用の選択性及び安定性に応じて当業者が適宜

適応できる。

本発明によるオリゴヌクレオチドは任意の公知方法により合成することができ
る。特に、核酸合成により製造することができる。当業者に公知の他の任意の方
法も当然使用できる。

本発明の方法を実施するためには、特異的リガンド（タンパク質、核酸等）を
支持体にグラフトしてもよいししなくてもよい。このためには種々の型の支持体
を使用することができ、例えば特に、カラムに予めパッケージングするかもしく
はしない機能性クロマトグラフィー支持体、機能性プラスチック表面又は磁性も
しくは非磁性の機能性ラテックスビーズが挙げられる。

クロマトグラフィー支持体が好ましい。例えば、使用可能なクロマトグラフィー
支持体はアガロース、アクリルアミド又はデキストラン及びそれらの誘導体（例
えばSephadex、Sephadose、Superose等）、ポリ（ス
チレンジビニルベンゼン）等のポリマー、又はグラフトするかしないシリカであ
る。クロマトグラフィーカラムは拡散又は灌流方式で使用することができる。

支持体に共有結合できるようにリガンドは一般に機能性である。オリゴヌクレ
オチドについては、例えばチオール、アミン又はカルボキシル末端基で5'又は
3'位を修飾し得る。特に、チオール、アミン又はカルボキシル基を附加すると
、例えばジスルフィド、マレイミド、アミン、カルボキシル、エステル、エポキ
シド、臭化シアン又はアルデヒド基をもつ支持体にオリゴヌクレオチドを結合す
ることが可能になる。これらの結合は、オリゴヌクレオチドと支持体の間にジス
ルフィド、チオエステル、エステル、アミド又はアミン結合を設定することによ
り形成される。例えば二官能性結合試薬等の当業者の公知の他の任意の方法も使
用できる。

更に、結合したオリゴヌクレオチドの活性を改善するために

は、「アーム」により結合すると有利である。アームを使用すると、実際に本發
明のDNA分子との相互作用条件を改善できるように支持体から選択された距離
にオリゴヌクレオチドを結合できる。アームはハイブリダイゼーションを妨げな

いヌクレオチド塩基から構成すると有利である。例えばアームはプリン塩基を含み得る。1例として、アームは配列G A G Gを含み得る。

本発明によるDNA分子は生物、組織又は所与の細胞に遺伝子を導入するために任意のワクチン接種又は遺伝子及び細胞治療用途で使用することができる。特に、患者に接種する目的で直接インビボ投与に使用してもよいし、インビトロ又はエクスビボ細胞改変に使用してもよい。この点で、本発明による分子はそのまま（裸のDNA形態）で使用してもよいし、種々の合成又は天然の化学及び／又は生化学ベクターと組み合わせてもよい。このようなベクターとしては、DNAと沈殿を形成することにより作用するカチオン（リン酸カルシウム、DEAEデキストラン等）を特に挙げることができ、この沈殿は細胞によって「貧食」されると考えられる。DNA分子を組み込み、形質膜と融合するリポソームでもよい。遺伝子導入用

合成ベクターは一般に、DNAと結合してこれと共に表面に正電荷をもつ粒子を形成するカチオン脂質又はポリマーである。これらの粒子は細胞膜の負電荷と相互作用した後、これを通過することが可能である。このようなベクターの例としてはDOGS (Transfectam (登録商標)) 又はDOTMA (Lipofectin (登録商標)) を挙げることができる。DNAを濃縮し、リガンドと結合したポリカチオン部分から構成されるキメラタンパク質も開発されており、前記リガンドは膜レセプターに結合してエンドサイトーシスにより細胞内に複合体を運搬する。本発明によるDNA分子はポンバードメント、エレクトロポレーション等の物理的トランスフェクション技術により遺伝子を細胞に導入するためにも使用できる。更に、治療に使用する前に、本発明の分子を場合により例えば酵素切断により直鎖化してもよい。

この点で、本発明の別の目的は少なくとも上記のようなDNA分子を含む任意の医薬組成物に関する。この分子は裸でもよいし、化学及び／又は生化学トランسفェクションベクターに結合してもよい。本発明による医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内、経皮等の経路

で投与するように調合することができる。注射可能又は塗布形態でD N A分子を使用するのが好ましい。特に治療部位のレベルに直接注射するように注射可能な調合物に医薬的に許容可能な任意キャリヤーと混合することができる。キャリヤーとしては、特に滅菌等張溶液、又は場合に応じて滅菌水もしくは生理食塩水を加えると注射可能な溶液とすることができる乾燥組成物、特に凍結乾燥組成物が挙げられる。特にグルコース又は塩化ナトリウムを含む希釈されたT r i s又はP B S緩衝液が挙げられる。患者の患部領域に核酸を直接注射すると、患部組織のレベルに治療効果を集中できるので有利である。核酸の使用量は種々のパラメーター、特に遺伝子、ベクター、使用する投与方法、該当疾病又は所望の治療期間に応じて適応できる。

本発明のD N A分子は1種以上の有用遺伝子、即ち標的細胞中で転写して、好ましくは翻訳されると、治療、ワクチン、農学的又は獣医学的に有用な産物を產生する1種以上の核酸（c D N A, g D N A, 合成又は半合成D N A等）を含み得る。

治療用有用遺伝子としては、より特定的には酵素をコードする遺伝子、血液誘導体、ホルモン、リンホカイン（例えばインターロイキン、インターフェロン、T N F等）（F R 9 2 /

0 3 1 2 0）、成長因子、神経伝達物質又はその前駆物質もしくは合成酵素、栄養因子（例えばB D N F、C N T F、N G F、I G F、G M F、a F G F、b F G F、N T 3、N T 5等）、アポリポタンパク質（例えばA p o A I、A p o A I V、A p o E等）（F R 9 3 / 0 5 1 2 5）、ジストロフィン又はミニジストロフィン（F R 9 1 / 1 1 9 4 7）、腫瘍抑制遺伝子（例えばp 5 3、R b、R a p 1 A、D C C、k - r e v等）（F R 9 3 / 0 4 7 4 5）、因子V I I、V I I I、I X等の凝血関連因子をコードする遺伝子、自殺遺伝子（例えばチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ等）、更には天然又は人工免疫グロブリン（F a b、S c F v等）、リガンドR N A（W O 9 1 / 1 9 8 1 3）の全部又は一部等を挙げることができる。治療遺伝子は標的細胞で発現されると遺伝子の発現又は細胞m R N Aの転写を制御することが可能なアンチセンス遺伝子又は配列で

もよい。このような配列は、例えばヨーロッパ特許第E P 1 4 0 3 0 8号に記載の技術に従って標的細胞で細胞m R N Aに相補的なR N Aに転写し、そのタンパク質への翻訳を阻止することができる。

有用遺伝子はワクチン接種用遺伝子でもよく、即ちワクチン

製造の目的でヒト又は動物で免疫応答を生じることが可能な抗原ペプチドをコードする遺伝子でもよい。このような遺伝子としては特に、エプスタイン-バールウイルス、H I Vウイルス、B型肝炎ウイルス（E P 1 8 5 5 7 3）、偽狂犬病ウイルスの特異抗原ペプチド、又は腫瘍特異抗原ペプチド（E P 2 5 9 2 1 2）が挙げられる。

一般に、本発明のプラスミド及び分子において治療、ワクチン、農学又は獣医学用有用遺伝子は更に、標的細胞又は生物（即ち哺乳動物）において機能する転写プロモーター領域と、3'未満に位置し、転写終結シグナル及びポリアデニル化部位を表す領域も含む（発現カセット）。プロモーター領域としては、該当細胞又は生物で機能し得るときに着目遺伝子の発現に天然に関与するプロモーター領域が挙げられる。別の起源の領域でもよい（他のタンパク質の発現に関与する領域でもよいし、合成領域でもよい）。特に、真核又はウイルス遺伝子のプロモーター配列を挙げることができる。例えば、標的細胞のゲノムに由来するプロモーター配列を挙げることができる。真核プロモーターとしては、ある遺伝子の転写を特異的又は非特異的、誘導又は非誘導的に強弱いずれかで刺激又は抑制する任意のプロモーター

ラスミド又は誘導配列を使用することができる。特に、ユビキチンプロモーター（H P R T、P G K、 α -アクチン、チューブリン等の遺伝子のプロモーター）、中間フィラメントのプロモーター（G F A P、デスミン、ビメンチン、ニューロフィラメント、ケラチン等の遺伝子のプロモーター）、治療遺伝子プロモーター（例えばM D R、C F T R、V I I I 因子、A p o A I 等の遺伝子のプロモーター）、組織特異的プロモーター（ピルビン酸キナーゼ、ビリン、脂肪酸結合性腸タンパク質、平滑筋細胞の α アクチン等の遺伝子のプロモーター）、又は刺激

応答プロモーター（ステロイドホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター等）を挙げることができる。更に、ウイルスのゲノムに由来するプロモーター配列、例えばアデノウイルスのE1A及びMLP遺伝子のプロモーター、CMVの初期プロモーター又はRSVのLTRのプロモーター等でもよい。更に、活性化配列、調節配列又は組織特異的もしくは過半数発現を可能にする配列の付加によってこれらのプロモーター領域を改変してもよい。

更に、有用遺伝子は標的細胞の分泌経路に合成物を導くシグナル配列を含んでいてもよい。このシグナル配列は合成物の天

然シグナル配列でもよいし、他の任意の機能シグナル配列又は人工シグナル配列でもよい。

有用遺伝子に応じて、本発明のDNA分子は遺伝病（ジストロフィー、囊胞性線維症等）、神経変性病（アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS等）、癌、凝血障害又はリポタンパク異常血症に結び付けられる疾病、ウイルス感染に結び付けられる疾病（肝炎、 AIDS等）等を含む多数の疾病的治療もしくは予防、又は農学及び獣医学等の分野で使用できる。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は単なる例示であってこれによって発明を制限するものではない。

図面の説明

図1：ゲノムに組み込んだカセットからのミニサークルの生産。

図2：プラスミドからのミニサークルの生産。

図3：リガンドに特異的な配列を含むミニサークルの生産。

図4：pXL2649の構築。ori：複製起点； Kan^r：カナマイシン耐性を付与するマーカー遺伝子； Amp^r：アンピシリン耐性を付与するマーカー遺伝子； galK：大

腸菌のガラクトシダーゼ遺伝子； lacZ：ラクトースオペロンのプロモーター。

図5：プラスミドpXL2650、プラスミドpXL2650から生産される

ミニサークル及び対照PGL2 (Promega Biotech) をマウス織維芽細胞NIH3T3にトランスフェクション後に得られるルシフェラーゼ活性。トランスフェクションは、各ウェル当たりDNA 0.5mg、各ウェル当たり細胞50000個の条件下で実施した。使用したリポフェクタントはRPR115335である。リポフェクタント/DNA電荷比の関数としてタンパク質1μg当たりのRLUとして結果を報告する。

図6：プラスミドpXL2793の構築。このプラスミドは組換え後にホモプロン-ホモリミジン合成配列とpXL2727のルシフェラーゼカセットを含むミニサークルを生じる。

図7：レーン1は三重螺旋カラム精製後に溶出したフラクションのS_a1 I消化物に対応する。レーン2は三重螺旋カラム精製後に溶出したフラクションのX_{m n} I消化物に対応する。レーン3は三重螺旋カラム精製後に溶出したフラクションの非消化物に対応する。レーン4はプラスミドpXL2793の非

誘導非消化物に対応する。レーン5及び6は夫々直鎖状DNA及び超らせんDNAのサイズマーカーに対応する。

図8：プラスミドpXL2776の構築の模式図。

図9：プラスミドpXL2777及びpXL2960の構築の模式図。

図10：大腸菌バクテリオファージ1のインテグラーゼがプラスミドpXL2777及びpXL2960に及ぼす作用。M：直鎖状DNA又は超らせんDNAの1kb分子量マーカー。N. I. : 非誘導。I : 誘導。N. D. : 非消化。

図11：プラスミドpXL2777及びpXL2960における大腸菌でのバクテリオファージ1のインテグラーゼの組換えの動力学。2' : 2分。O/N : 14時間。M : 直鎖状DNA又は超らせんDNAの1kb分子量マーカー。N. I. : 非誘導。I : 誘導。N. D. : 非消化。

一般クローニング及び分子生物学技術

臭化エチジウム-塩化セシウム勾配によるプラスミドDNAの遠心分離、制限酵素消化、ゲル電気泳動、アガロースゲルからのDNAフラグメントの電気溶離、大腸菌での形質転換、核酸沈降等のような慣用分子生物学法は文献に記載され

ている

(Maniatisら, 1989, Ausubelら, 1987)。核酸配列は既に報告されているプロトコール (Ausubelら, 1987) に従って鎖終止法により決定した。

制限酵素はNew-England Biolabs (Biolabs)、Bethesda Research Laboratories (BRL) 又はAmersham Ltd (Amersham) から入手した。

連結にあたっては、DNAフラグメントを0.7%アガロースゲル又は8%アクリルアミドゲル上でサイズに従って分離し、電気泳動後に電気溶離により精製し、フェノール抽出し、エタノール沈殿後、ファージT4 (Biolabs) のDNAリガーゼの存在下、緩衝液50mM Tris-HCl (pH 7.4), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 2mM ATP中でインキュベートする。オリゴヌクレオチドは、自動DNA合成器Biosearch 8600を製造業者の指示に従って使用し、シアノエチル基によりb位置で保護したホスホアミダイト誘導体を用いるホスホアミダイト化学 (Sinhaら, 1984, Giles 1985) を使用することにより合成する。

連結したDNAを使用して、コンピテントにした株即ち大腸菌MC1060 [LacIOPZYA] X74, galU, galK, strA, hsdR] (Casadabanら, 1983); HB101 [hsdS20, supE4, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xy1-5, mtl-1, λ-, F-] (Maniatisら, 1989) 及びDH5α [endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA, λ-, Φ80, dlacZΔM15] をプラスミドについて形質転換する。

細菌学的部分にはLB及び2XY培地を使用する (Maniatisら, 1989)。

プラスミドDNAはアルカリ溶解法 (Maniatisら, 1989) により

精製する。

使用した用語及び略語の定義

組換えDNA：天然には結合しないDNA配列を同一微生物の内部に結合するか又はDNAフラグメントを特異的に突然変異誘発することが可能な技術の総称。

ATP：アデノシン5'－三リン酸

BSA：ウシ血清アルブミン

· PBS：10mMリン酸緩衝液，150mM NaCl，pH7.4。

dNTP：2' - デオキシリボヌクレオシド5' - 三リン酸。

DTT：ジチオトレイトル

k b：キロベース

b p：塩基対。

実施例1：バクテリオファージの反復順方向a t t P及びa t t B配列をもつプラスミドの構築

プラスミドpNH16aはa t t P配列をもつバクテリオファージのフラグメントを既に含んでいるので、出発材料として使用した(HasanとSzybalski, 1987)。このプラスミドをEcoRIで消化した。a t t B配列(Landy, 1989)を含むオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドは下記配列をもつ。

オリゴヌクレオチド5476(配列番号1)

5' - AATTGTGAAGCCCTGCTTTTATACTAACTTGAGCGG - 3'

オリゴヌクレオチド5477(配列番号2)

5' - AATTCCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCAGGCCTCAC - 3'。

これらのオリゴヌクレオチドをハイブリダイズしてa t t B配列を再構成した後、pNH16a(HasanとSzybalski, 1987)の4.2kbのEcoRIフラグメントのEcoRI部位に連結した。DH5 α の形質転換後、組換えクローンを保存した。こうして構築したプラスミドをpXL2648と

命名した（図4参照）。このプラスミドは順方向にバクテリオファージのa t t
P及びa t t B配列を含む。バクテリオファージのインテグラーゼ（Intタン
 パク質）の作用下で2つのa t t部位間に含まれる配列の切り出しが行われるは
 ずである。この結果、外部に配置されたプラスミドの複製起点と耐性マーカーか
 ら2つのa t t配列間に挿入された配列が分離される。

実施例2：大腸菌におけるミニサークルのインビボ生産

カナマイシン耐性カセットをプラスミドpXL2648のE c o R I部位にク
 ローニングした（図4）。このカセットはプラスミドpUC4KIXX（Pha
 rmacia Biotech.）に由来する。このために、プラスミドpUC
 4KIXX 10gをE c o R Iで消化した後、アガロースゲル電気泳動により
 分離し、カナマイシン耐性マーカーを含む1. 6 kb

フラグメントを電気溶離により精製した後、E c o R Iにより直鎖化したプラス
 ミドpXL2648に連結した。大腸菌DH5 α に形質転換してカナマイシン耐
 性の選択後に組換えクローンを選択した。1つのクローンで所期制限プロファイル
 が観察され、このクローンをpXL2649（図4）と命名した。このプラスミ
 ドを形質転換により2種の大腸菌株、即ちD1210 [h s d S 2 0, s u p E
4 4, r e c A 1 3, a r a - 1 4, p r o A 2, l a c Y 1, g a l K 2, r
p s L 2 0, x y 1 - 5, m t 1 - 1, λ -, F-, l a c I q] (Saddle
 rら, 1980)と、ファージx i s - (Xis-K11-) c I 8 5 7 (Pod
 jaskaら, 1985)により溶原化したDH1210に対応するD1210
 HPに導入した。

カナマイシン（50mg/1）を加えた2XY培地上で30°Cで形質転換株
 を選択した。選択培地で再単離後、カナマイシン（50mg/1）を補充したL
 培地5mlに株を接種した。攪拌（5cmの回転振幅）下に30°Cで16時間イ
 ンキュベーション後に培養物を同一培地100mlで1/100倍に希釈した。
 これらの培養物を0.3のOD₆₁₀に達するまで同一条件下でインキュベートし
 た。この時点での培養物の2分の1を取

り出した後、42°Cで10分間インキュベートしてファージの溶菌サイクルを誘導し、従って、インテグラーゼの発現を誘導した。このインキュベーション後、培養物を30°Cに戻した後、これらの条件下で1時間インキュベートした。次に、培養を停止し、プラスミドDNAのミニ調製を行った。条件に関係なく、プラスミドpXL2649の非消化プラスミドDNAのアガロースゲル電気泳動プロファイルは、D1210株でも熱誘導しなかったD1210HP株でも変わらなかった。他方、42°Cで10分間インキュベートした後に30°Cで1時間培養したD1210HPでは、予想通りプラスミドは最早存在せず、より迅速に移動し且つEcoRI部位を含む低分子量分子と、単一のBglI部位を含むより高分子量の分子との2種の環状DNA分子が認められる。従って、2つのatt配列間に存在する配列が確かに切り出され、全複製起点を欠失するミニサークルが生成されている。複製起点をもたないこの超らせん環状DNAをミニサークルと呼ぶ。この呼称は実際に分子の環状特徴を十分考慮したものである。出発プラスミドpXL2649は存在するが、attによってフランкиングされた配列が切り出されたプラスミドの約10%である。

ミニサークルはプラスミドDNAと同様に超らせん状であるので、ミニサークルをその後、慣用プラスミドDNA精製技術により精製してもよい。これらの技術は、臭化エチジウムの存在下での塩化セシウム密度勾配精製や、アニオン交換カラムの使用を含む(Maniatis, 1989)。更に、複製起点と選択マーカーに対応するプラスミドDNAがかなり多量に存在すると予想される場合には、プラスミドを消化し且つミニサークルを消化しない1種以上の制限酵素を精製後に使用してもよく、こうすると、臭化エチジウムの存在下の塩化セシウム密度勾配等のように直鎖状DNAから超らせんDNAを分離する技術により分離することができる(Maniatis, 1989)。

実施例3：ルシフェラーゼ発現カセットを含むミニサークルの生産

これらのミニサークルのインビオ使用を試験するために、その発現に必要な配列をもつリポーター遺伝子をプラスミドpXL2649にクローニングした(実施例2参照)。このような遺伝子は、より特定的には対照pGLO(Prom

g a Biotech.) に由来する 3150 bp の BglI I - BamH I

mHI カセットである。このカセットは SV40 の初期プロモーターと、SV40 の初期プロモーターのエンハンサーと、Photinus pyralis のルシフェラーゼ遺伝子と、SV40 に由来するポリアデニル化部位を含む。3150 bp の BglI I - BamH I フラグメントを BamH I で消化した pXL2649 の BamH I 部位にクローニングし、カナマイシン耐性カセットを対照 pGL2 のルシフェラーゼ発現カセットによって置換した。こうして構築したプラスミドを pXL2650 と命名した。このプラスミドでは attP 及び attB 部位がルシフェラーゼ発現カセットにフランкиングしている。部位特異的組換えにより、ルシフェラーゼの発現に必要な配列とルシフェラーゼ遺伝子のみを切り出すことができる。これは実施例 2 に記載したと全く同様に実施することができる。プラスミド pXL2650 のようなミニサークルは、インビボ又はインビトロトランスフェクション実験で後で使用することができる。

アンピシリン (50 mg/ml) を補充した 2XY 培地で D1210HP pXL2650 株 1 リットルを 30°C で培養した。OD₆₁₀ が 0.3 になったら 42°C で 20 分間、次いで 30°C で 20 分間培養した。透明溶菌体技術 (Maniatis, 1989)

s ら、1989) 後に臭化エチジウムを補充した塩化セシウム密度勾配で精製し (Maniatis ら、1989)、次いで臭化エチジウムをイソプロパノールで抽出して透析することにより、エピソーム DNA を調製した。この DNA はミニサークルを含むことが判明した。この調製物 100 μg を PstI で消化した後、臭化エチジウムを補充した塩化セシウム密度勾配で水解物を精製した (Maniatis ら、1989)。調製物を AlwNI と XmnI で同時に消化しても同一結果が得られる。超らせん形態を回収し、臭化エチジウムの除去 (Maniatis ら、1989) 後、複製起点と全マーカー遺伝子を欠失するミニサークル以外の何物でもないことが判明した。このミニサークル調製物はインビトロ及びインビボトランスフェクション実験に使用することができる。

実施例4：ミニサークルによる哺乳動物細胞、より特定的にはヒト細胞のインビトロトランスフェクション

実施例3に記載したようなPhotinus pyralisのルシフェラーゼの遺伝子を含むミニサークルDNA、即ちプラスミドpXL2650から生成したミニサークルに対応するDNAを150mM NaClで希釈し、トランスクタ

ントと混合する。ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS, Transfectam(登録商標), Promega)、Lipofectin(登録商標)(Gibco-BRL)等の種々の市販トランスクタントを種々の正負電荷比で使用することができる。1例として、3以上の電荷比でトランスクタント剤を使用した。混合物をボルテックスし、周囲温度で10分間放置し、ウシ胎児血清を含まない培地で希釈した後、培養ウェル当たりDNA 2μgの割合で細胞に加える。使用する細胞はヒト結腸腺癌に由来するCaCO-2であり、記載のプロトコール(Willsら, 1994)に従って培養し、実験前日に細胞50,000個/ウェルの割合で48ウェル培養プレートに接種する。37℃で2時間後、10%v/vウシ胎児血清を加え、細胞を5%CO₂の存在下で37℃で24時間インキュベートする。細胞をPBSで2回洗浄し、記載のプロトコール(Promegaキット等)によりルシフェラーゼ活性を測定する。種々の種に由来する他の系(繊維芽細胞、リンパ球等)を使用してもよいし、個体から採取した細胞(繊維芽細胞、ケラチノサイト、リンパ球等)をトランスクタクション後に再注入してもよい。

実施例5：NIH3T3細胞のインビトロトランスフェクション

実施例3に記載したようなPhotinus pyralisのルシフェラーゼの遺伝子を含むミニサークルDNA、即ちプラスミドpXL2650から生成されるミニサークルに対応するDNAを哺乳動物細胞にインビトロトランスフェクトし、同一発現カセットを含むpXL2650及び対照PGL2(Promega Biotech.)を対照として使用した。使用した細胞はマウス繊維芽

細胞N I H 3 T 3であり、実験前日に24ウェル培養プレートに細胞50,000個／ウェルの割合で接種した。プラスミドを150mM NaClで希釈し、リポフェクタントR P R 1 1 5 3 3 5と混合する。この他、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(D O G S, Transfectam(登録商標), Promega)(Demeneixら, Int. J. Dev. Biol. 35(1991) 481)、Lipofection(登録商標)(Gibco-BRL)(Fegnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(1987) 7413)等の他の種々の市販物質も利用できる。リポフェクタントの正電荷／DNAの

負電荷の比は3以上を使用する。混合物をボルテックスし、周囲温度で10分間放置し、ウシ胎児血清を含まない培地で希釈した後、培養ウェル当たりDNA0.5mgの割合で細胞に加える。37℃で2時間後、10%v/vウシ胎児血清を加え、細胞を5%CO₂の存在下で37℃で48時間インキュベートする。細胞をPBSで2回洗浄し、記載のプロトコール(Promegaキット、Promega Corp. Madison, WI)に従って光度計Lumat LB 9501(EGet G Berthold, E v r y)でルシフェラーゼ活性を測定する。上記条件に対応するトランスフェクション結果を図5に示す。結果は、ミニサークルが複製起点をもつプラスミドと同一のトランスフェクション特性をもつことを明白に示す。従って、これらのミニサークルは遺伝子治療用途で標準プラスミドと同様に使用できると考えられる。

実施例6：三重螺旋相互作用を使用したミニサークルのアフィニティー精製

本実施例は、精製しようとするミニサークルに存在する合成DNA配列との間で行われる三重螺旋型相互作用により、ミニサークルを切り出したプラスミド形態を含む混合物から本発明

によるミニサークルを精製する方法に関する。本実施例は、ミニサークルを切り出したプラスミド形態からミニサークルを分離するために、三重螺旋の形成による精製技術をどのように使用できるかを示すものである。

6-1. 合成ホモプリン-ホモピリミジン配列を含むミニサークルの生産

6-1. 1. プラスミド pXLP2650へのホモプリンーホモピリミジン配列の挿入

プラスミド pXL2650 は *Photinus pyralis* のルシフェラーゼの遺伝子を含むカセットの直後に单一の BamH I 部位をもつ。この単一の部位を使用して次の 2 種のオリゴヌクレオチドをクローニングした。

4 9 5 7 (配列番号 3)

4 9 5 8 (配列番号 4)

これらのオリゴヌクレオチドは一旦ハイブリダイズしてプラ

スミド p X L 2 6 5 0 にクローニングすると、上述のようにホモプリン一ホモピリミジン配列 (G A A)₁₇ を付加する。

このクローニングを実施するために、まず最初にオリゴヌクレオチドを次のようにハイブリダイズした。これらの2種のオリゴヌクレオチド各1 gを最終400mMの緩衝液50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂中で混合した。この混合物を95℃まで加熱した後、周囲温度にして温度をゆっくりと低下させた。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド混合物10 ngをBamHIで直鎖化した200 ngのプラスミドpXL2650と連結し、最終30 mlとした。連結後、アリコートをDH5で形質転換した。アンピシリン(50 mg/1)を補充したL培地に形質転換混合物をプレーティングした。24個のクローンをPf1MIとBamHIで消化した。1個のクローンは50 bp增加した950 bpのPf1MI-BamHIフラグメントのサイズをもつことが判明した。このクローンを選択し、pXL2651と命名した。

プラスミドpXL2651をWizard Megaprepキット(Pro

meg a Corp., Madison, WI)により製造業者の指示に従って精製した。

6-1. 2. プラスミド pXL2649へのホモプリンーホモピリミジン配列の挿入

a) pXL2649のカナマイシンカセットの両側への新しい制限部位の挿入
 実施例2に記載したようなプラスミドpXL2649をEcoR Iで消化し、
 プラスミドpUC4KIXX (Pharmacia Biotech, Uppsala, スウェーデン) に由来するカナマイシンカセットを取り出した。このために、5mgのプラスミドpXL2649をEcoR Iで消化した。4. 2kbのフラグメントをアガロースゲル電気泳動により分離し、電気溶離により精製した。

他方では、プラスミドpXL1571を使用した。このプラスミドはプラスミドpFR10 (Gene 25 (1983), 71-88) から構築し、カナマイシン遺伝子に対応するpUC4KIXXに由来する1. 6kbフラグメントをSstIに挿入した。このクローニングにより、カナマイシン遺伝子の両側に1 2個の新しい制限部位を挿入することができた。

5μgのpXL1571をEcoR Iで消化した。カナマイシン遺伝子に対応する1. 6kbフラグメントをアガロースゲ

ル電気泳動により分離し、電気溶離により精製した。次に、pXL2649の4. 2kbのEcoR Iフラグメントと連結した。大腸菌DH5αで形質転換してカナマイシン及びアンピシリン耐性の選択後に組換えクローンを選択した。1個のクローンで所期制限プロファイルが観察され、このプラスミドクローンをpXL2791と命名した。

b) プラスミドpXL2791からカナマイシンカセットの抽出
 プラスミドpXL2791をSstIで消化してカナマイシンカセットを取り出した。4. 2kbフラグメントをアガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キットJet sorb (Genomed)により精製した。その後、フラグ

メントを連結した。大腸菌DH5αに形質転換後に組換えクローンをアンピシリン耐性について選択した。1個のクローンで所期制限プロファイルが観察された。このプラスミドクローンをpXL2792と命名した。このクローンは特にa_t_t_P及びa_t_t_B部位間にS_a_1_I及びX_m_a_I制限部位を含む。

c) ホモプリンーホモピリミジン配列とルシフェラーゼの発現を可能にするカセットをプラスミドpXL2792の2部位

a_t_t_P及びa_t_t_B間にクローニング

プラスミドpXL2727を使用した。このプラスミドをX_m_a_IとS_a_1_Iで消化すると、プロモーターpCMV、P_h_o_t_i_n_u_s_p_y_r_a_l_i_sのルシフェラーゼの遺伝子、SV40に由来するポリアデニル化部位及びホモプリンーホモピリミジン配列を含むフラグメントを取り出すことができる。前記ホモプリンーホモピリミジン配列は次の2種のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション及びクローニング後に得られた。

6006：（配列番号16）

5' - GATCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG
AAGAAGAACTGCAGATCT-3'

6008：（配列番号17）

5' - GATCAGATCTGCAGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCA-3'

pXL2727上に存在するホモプリンーホモピリミジン配列をSequence analysis法Version 2.0 (United States Biochemical Corporation)により配列決定した。得られた結果は、
プラスミ

D pXL2727上に実際に存在するホモプリンーホモピリミジン配列が、オリゴヌクレオチド6006及び6008の配列から予想される通り、10個の反復(GAA-CTT)と17個の非反復を含むことを示す。オリゴヌクレオチド6

008に対応する鎖で配列決定後に読み取られたプラスミドpXL2727上に
実際に存在する配列は次の通りである。

5' -

1 μgのpXL2727をXmaIとSalIで消化した。3. 7kbのフラグメントをアガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キットJetsorb (Genomed)により精製した。他方では、1. 7mgのpXL2792をXmaIとSalIで消化した。4. 2kbフラグメントをアガロースゲル電気泳動により分離し、ゲル抽出キットJetsorb (Genomed)により精製し、pXL2727の3. 7kbのXmaI-SalIフラグメントと連結した。大腸菌DH5αで形質転換及びアンピシリン耐性の選択後に組換えクローンを選択した。1個のクローンで所期制限プロファイルが観察さ

れ、このクローンを pXL2793 と命名した。既述方法 (Maniatisら, 1989) に従って塩化セシウム密度勾配を使用してプラスミド pXL2793 を精製した。

6-2. ミニサークル上に存在するホモプリン-ホモピリミジン配列との三重螺旋型相互作用を生じることが可能なカラムの調製

次のようにカラムを調製した。

使用したカラムはNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド、Pharmacia）
a) 1 mlで活性化したHiTrapカラムであり、蠕動ポンプ（流量<1 ml
/分）に連結した。使用した特定オリゴヌクレオチドは5'末端にNH₂基をも
つ。

プラスミド pX L 2 6 5 1に使用したオリゴヌクレオチドの配列は次の通りである。

5' - GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT - 3' (配列番号5)

プラスミド pX L 2793に使用したオリゴヌクレオチドの配列は次の通りである（オリゴ116418）。

5' - C T T C T T C T T C T T C T T C T T - 3' (配列番号19)。

使用した緩衝液は次の通りである。

結合用緩衝液： 0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH8.3

洗浄用緩衝液：

緩衝液A： 0.5M エタノールアミン, 0.5M NaCl, pH8.3

緩衝液B： 0.1M 酢酸塩, 0.5M NaCl, pH4

固定及び溶離用緩衝液

緩衝液F： 2M NaCl, 0.2M酢酸塩, pH4.5

緩衝液E： 1M Tris, HCl, pH9, 0.5mM EDTA。

カラムは次のように調製する。

カラムを 6 ml の 1 mM HCl で洗浄した後、結合用緩衝液 (1 ml 中 50 nmol) で希釈したオリゴヌクレオチドをカラムに加えて周囲温度で 30 分間放置する。カラムを結合用緩衝液 3 ml、次いで緩衝液 A 6 ml、次いで緩衝液 B 6 ml で洗浄する。後者 2 種の緩衝液はカラムに順次 3 回加え、こうしてオリゴヌクレオチドを CONH 結合によりカラムに共有結合させる。カラムを 4 °C で PBSO, 1% NaNO₃ 中で保存する。

6-3. ホモプリンーホモピリミジン合成配列を含むミニサークルの三重螺旋型相互作用による精製

6-3. 1. プラスミド pXL2651 の精製

プラスミド pXL2651 を D1210HP 株に導入した。

この組換え株 [D1210HP (pXL2651)] を実施例 3 に記載したように培養し、Photinus pyralis のルシフェラーゼの遺伝子を含むミニサークルを生成した。培養物 20 ml を取り出して遠心分離した。細胞残渣を 1.5 ml の 50 mM グルコース、25 mM Tris 25 HCl pH 8、10 mM EDTA にとる。2 ml の 0.2 M NaOH, 1% SDS で溶解させ、1.5 ml の 3 M 酢酸カリウム (pH 5) で中和させる。次に DNA を 2-プロパノール 3 ml で沈降させ、残渣を 0.5 ml の 0.2 M 酢酸ナトリウム

(pH 5)、0.1M NaClにとり、上述のようにミニサークルに含まれるポリGAA配列と三重螺旋型相互作用を形成することが可能なオリゴヌクレオチドカラムに加える。カラムを6mLの緩衝液Fで予め洗浄しておき、カラムに加えた後に精製すべきミニサークルを含有する溶液を周囲温度で2時間インキュベートする。カラムを10mLの緩衝液Fで洗浄した後、緩衝液Eで溶離する。

こうしてミニサークルに対応する精製DNAが得られる。得られたミニサークルをアガロースゲル電気泳動と臭化エチジウム染色により分析すると、スーパーコイル環状DNAの単一バ

ンドの形態である。調製物中に残存する出発プラスミドpXL2651は5%未満である。

6-3. 2. プラスミドpXL2793の精製

7. 9kbのプラスミドpXL2793をD1210HP株に導入した。この組換え株を実施例3に記載したように培養し、Photinus pyralisのルシフェラーゼの遺伝子を含む4kbのミニサークルと3.9kbのプラスミドを生成した。培養物200mLを取り出して遠心分離した。細胞残渣をKit Wizard Megaprep (Promega Corp., Madison, WI) により製造業者の指示に従って処理した。DNAを最終容量2mLの1mM Tris, 1mM EDTA (pH 8) にとった。このプラスミドサンプル250μLを最終容量2.5mLの緩衝液Fで希釈した。カラムは6mLの緩衝液Fで予め洗浄しておいた。上記のように調製したミニサークルに含まれるポリGAA配列と三重螺旋型の相互作用を形成することが可能なオリゴヌクレオチドカラムに希釈サンプル全体を加えた。10mLの緩衝液Fで洗浄後、緩衝液Eで溶離した。溶離したサンプルを1mLフラクションずつ回収した。

この方法により、pXL2793から生成されるミニサークルに対応する精製DNAが得られる。カラムから溶出したDNAサンプルをアガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色と酵素制限により分析した。このために、OD_{260nm}滴定によりDNAを含有すると判断される溶出フラクションを1mM Tris,

1 mM EDTAで24時間透析した後、イソプロパノールで沈降させ、200 mlのH₂Oにとった。こうして得られたサンプル15 μlを、ミニサークルには存在するが組換えにより生成された3.9 kbのプラスミドには存在しない制限部位であるS a 1 I、又は組換えにより生成された3.9 kbのプラスミドには存在するがミニサークルには存在しない制限部位であるX m n Iにより消化した。得られた結果を図7に示すが、同図はミニサークルが組換えプラスミドを含まないことを立証している。

実施例7：ミニサークルによる哺乳動物細胞のインビットransフェクション

本実施例はルシフェラーゼの遺伝子をコードするミニサークルの新生ラットの脳への導入に関する。ミニサークル(30 μg)を滅菌150 mM NaClで濃度1 μg/μlに希釀す

る。次に2以下の正負電荷比でジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)等の合成トランスフェクタントを加える。混合物をボルテックスし、麻酔した新生ラットの大脳皮質にマイクロマニピュレーターとマイクロシリジングを用いてDNA 2 μgを注入する。48時間後に脳を取り出し、均質化し、遠心分離し、上清を使用して記載のプロトコール(例えばPromegaキット)によりルシフェラーゼを定量する。

実施例8：ミニサークル又はミニプラスミドの位相異性体の存在を低下させるためのRK2の遺伝子座p a rの使用

本実施例は、大腸菌でのバクテリオファージIのインテグラーゼの作用後に、i) 順方向a t t P及びa t t B配列をもつプラスミド、ii) ミニサークル又はiii) ミニプラスミドから誘導される位相形態の存在を立証する。本実施例は、RK2の遺伝子座p a r(Gerlitzら, 1990, J. Bacteriol. 172, p. 6194)の使用によりこれらの位相又はオリゴマー形態を分解できることも示す。実際に、この遺伝子座は特にmrs(マルチマーフ分解系)(Eberlら, 1994, Mol. Microbiol. 12, p. 131)部位に作用するレゾルベasesをコードするp a r A遺伝子を含む。8-1. プラスミドpXL2777及びpXL2960

の構築

プラスミド pXL2777 及び pXL2960 はベクター pXL2776 から誘導され、共通して ColE1 の最小レプリコンと、カナマイシン耐性をコードするトランスポゾン Tn5 の遺伝子と、バクテリオファージ 1 の順方向 aattP 及び aattB 配列をもつ。これらのプラスミドは aattP 及び aattB 配列間に挿入された遺伝子の点で相違し、特に pXL2777 は（スペクチノマイシン耐性遺伝子をコードする）オメゴンカセットを含み、プラスミド pXL2960 は R K 2 の遺伝子座 par をもつ。

8-1. 1. 最小ベクター pXL2658

ベクター pXL2658 (2.513 kb) は pBluecript に由来する ColE1 の最小レプリコン (ori) と、選択マーカーとしてカナマイシン耐性をコードするトランスポゾン Tn5 の遺伝子 (Km) をもつ。Klenow の作用により BsaI 末端を平滑にした後、pBKS+ (Stratagene 市販品) の 1.15 kb の BsaI-PvuII フラグメントを pUC4KIX (Pharmacia 市販品) の 1.2 kb の SmaI フラグメントとクローニングし、プラス

ミド pXL2647 を生成した。オリゴヌクレオチド 5' (AGC TTC TC G AGC TGC AGG ATA TCG AAT TCG GAT CCT CTA GAG CGG CCG CGA GCT CC) 3' (配列番号 20) 及び 5' (AGC TGG AGC TCG CGG CCG CTC TAG AGG ATC CG A ATT CGA TAT CCT GCA GCT CGA GA) 3' (配列番号 21) を相互にハイブリダイズした後、pXL2647 の HindIII 部位にクローニングし、こうして p2658 を構築する。このプラスミド上には、複製起点とカナマイシン耐性をコードする遺伝子の間に多重クローニング部位 SstI、NotI、XbaI、BamHI、EcoRI、EcoRV、PstI、XhoI 及び HindIII が存在する。

8-1. 2. ファージ 1 の aattP 及び aattB 配列を含むベクター pXL2776

ベクター pXL2776 (2.93 kb) は pBluecript に由来す

るC o l E 1の最小レプリコンと、カナマイシン耐性をコードする遺伝子と、バクテリオファージ1の順方向a t t P及びa t t B配列をもつ(図8参照)。S a c I及びH i n d I I I部位がクローニング後に再構成されないようにセンスオリゴヌクレオチド6194 5' (A C T A G T G G C C A T G)
C A T C C G C T C A A G T T A G T A T A A A A A G C A G G C T T C A G C G)3' (配列番号22)をアンチセンスオリゴヌクレオチド6195 5' (A G C T C T G A A G C C T G C T T T A T A C T A C T T G A G C G C A T G C A T G G C C A C T A G T A G C T)3' (配列番号23)とハイブリダイズした後にpX L 2658のS a c I及びH i n d I I I制限部位間に29bpのa t t B配列(M i z u u c h i l a, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 77, p3220)を導入した。このプラスミドのa t t B配列を確認してからS p e IとN s i Iで消化し、N s i I及びX b a I制限部位によってフランкиングされるa t t P配列を導入し、こうしてプラスミドpX L 2776を生成する。a t t P配列は、鋳型として(実施例2に記載したような)プラスミドpX L 2649と、センスオリゴヌクレオチド6190 5' (G C G T C T A G A A C A G T A T C G T G A T G A C A G A G)3' (配列番号24)及びアンチセンスオリゴヌクレオチド6191 5' (G C C A A G C T T A G C T T G C A C T G G A T T G C C G A)3' (配列番号25)を使用し、ハイブリダイゼーション温度を50°Cとするサイクルを30サイクル実施することにより、P C R增幅により得た。X b a I及びH i n d I I Iにより消化したP C R産物をファージM 13

m p E HのX b a I及びH i n d I I I部位間にクローニングした。増幅配列は、27480~27863位間でL a m b d a I I (R. W. H e n d r i x , J. W. R o b e r t s, F. W. S t a h l, R. A. W e i s b e r g編; Cold Spring Harbor Laboratory 1983)に記載されているa t t Pの配列に一致する。

8-1. 3. プラスミドpX L 2777

プラスミドpX L 2777 (6. 9kb)はpB l u e s c r i p tに由来するC o l E 1の最小レプリコンと、カナマイシン耐性をコードする遺伝子と、枯

草菌のレバンスクラーゼ (P. Gayら, 1983, J. Bacteriol. 153, p 1424) をコードする sacB 遺伝子により分離されたバクテリオファージ 1 の順方向 attP 及び attB 配列と、スペクチノマイシン S p 及びストレプトマイシン S m 耐性遺伝子をコードするオメゴン S p (P. Present k ら, 1984, Gene 29, p 303) をもつ。EcoRV 及び NsiI クローニング末端をもつカセット sacB-Sp はプラスミド pXL2757 (FR95/01632) に由来し、pXL2776 の EcoRV 及び NsiI 部位間にクローニングして p

XL2777 を形成した。

8-1. 4. プラスミド pXL2960

プラスミド pXL2960 (7.3 kb) は pBlue script に由来する Col E 1 の最小レプリコンと、カナマイシン耐性をコードする遺伝子と、i) 枯草菌のレバンスクラーゼ (P. Gayら, 1983, J. Bacteriol. 153, p 1424) をコードする sacB 遺伝子及び ii) RK2 の遺伝子座 par (Gericlitz ら, 1990, J. Bacteriol. 172, p 6194) により分離されたバクテリオファージ 1 の順方向 attP 及び attB 配列をもつ。BamH I 末端をもつカセット par はプラスミド pXL2433 (PCT/FR95/01178) に由来し、pXL2777 の BamH I 部位間に導入して pXL2960 を形成した。

8-2. ミニサークル又はミニプラスミドの位相異性体の分解

プラスミド pXL2777 及び pXL2960 を形質転換により大腸菌株 D1210HP に導入した。実施例 2 に記載した手順を次のように変更して形質転換株を選択及び分析した。610 nm における細胞の光学密度が 1.8 になったらインテグ

ラーゼの発現を 42°C で 15 分間誘導した後、30°C で 30 分間 (図 9 参照) 又は 2 分間～14 時間 (O/N) の可変時間 (図 10 参照) 細胞をインキュベートする。ミニサークル (EcoRI) もしくはミニプラスミド (BglII) 部分

に固有の制限酵素による消化前もしくは後（図Y参照）、又は大腸菌のDNAトポイソメラーゼAもしくはジャイレースの作用後に、非誘導及び誘導培養物由来するプラスミドDNAをアガロースゲル上で分析した。i) 分子量、ii) 制限酵素による直鎖化、iii) トポイソメラーゼA（弛緩型二量体）又はジャイレース（超らせん状二量体）の作用によるトポロジーの変化、iv) ミニサークル又はミニプラスミドに固有の内部フラグメントとの特異的ハイブリダイゼーションにより、ミニサークル又はミニプラスミドの超らせん二量体形態が明白に立証される。初期プラスミドよりも高分子量の他のトポロジー形態はミニサークル（EcoRI）又はミニプラスミド（BglIII）部分に固有の制限酵素による消化後に消滅するので、初期プラスミド又はミニサークル又はミニプラスミド由来する。これらの形態は初期プラスミドと同様にpXL2777よりもpXL2960のほうが著しく少ない（図10）。特に、細胞を30℃

で少なくとも30分間インキュベートした場合、プラスミドpXL2777には二量体形態のミニサークルがかなり存在するが、pXL2960では検出されない（図9及び10参照）。pXL2960では反応開始時（2～10分）に二量体のミニサークルが観察されるが、その後（30分後）は分解される（図10参照）。従って、遺伝子座p arは大腸菌でのバクテリオファージ1のインテグラーゼが順方向attP及びattB配列を含むプラスミドに作用する結果としてオリゴマー／トポロジー形態を有意に低下させる。

ヌクレオチド配列の表示

配列番号1：オリゴヌクレオチド 5' 4 7 6 :

5' - AATTGTGAAGCCTGCTTTTATACTAATTGAGCGG - 3'

配列番号2：オリゴヌクレオチド5'477：

5' - AATTCCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAAGCAGGCTTCAC - 3'

配列番号 3 : オリゴヌクレオチド 4 9 5 7 :

配列番号 4 : オリゴヌクレオチド 4 9 5 8 :

配列番号5：オリゴヌクレオチドポリC T T：

5' - GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT - 3'

配列番号 6 : (λ ファージの a t t B 配列) :

5' - CTGCTTTTATACTAACTTG- 3'

配列番号 7 : (λ ファージの a t t P 配列) ;

5' - CAGCTTTTATACTAAGTTG - 3'

配列番号 8 : (ファージ P 2 2 の a t t B 配列) :

5' - CAGCGCATTCTGTAATGCGAAG - 3'

配列番号 9 : (ファージ P 2 2 の a t t P 配列) :

5' - CTTATAATTCTGTAATGCGAAG - 3'

配列番号10：（ファージF80のa t t B配列）：

5'-AACACTTCTTAAATGGTT-3'

配列番号11：（ファージF80のa t t P配列）：

5'-AACACTTCTTAAATTGTC-3'

配列番号12：（ファージHP1のa t t B配列）：

5'-AAGGGATTTAAAATCCCTC-3'

配列番号13：（ファージHP1のa t t P配列）：

5'-ATGGTATTTAAAATCCCTC-3'

配列番号14：（プラスミドpSAM2のa t t配列）：

5'-TTCTCTGTCGGGTGGCGGGATTGAACCCACGACCTTCTCGTCCCGAA-3'

配列番号15：（トランスポゾンTn3のレゾルペースの認識配列）：

5'-CGTCGAAATATTATAAATTATCAGACA-3'

配列番号16：オリゴヌクレオチド6006：

5'-GATCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA-GAACTGCAGATCT-3'

配列番号17：オリゴヌクレオチド6008：

5'-GATCAGATCTGCAGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCA-TTCTTCTTCTTCA-3'

配列番号18：（オリゴヌクレオチド6008に対応するプラスミドpXL2727上に存在する配列）：

5' - GATCAGATCTGCAGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTC-
TTCA-3'

配列番号 19 : (オリゴヌクレオチド 1 1 6 4 1 8) :

5' - CTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3'

配列番号 20 : (オリゴヌクレオチド 5 5 4 2) :

5' - AGCTTCTCGAGCTGCAGGATATCGAATTGGATCCTCTAGAGCGGCCGCGAGC-TCC-3'

配列番号 21 : (オリゴヌクレオチド 5 5 4 3) :

5' - AGCTGGAGCTGGGGCCGCTCTAGAGGATCCGAATTGATATCCTGCAGCTCGAGA-3'

配列番号 22 : センスオリゴヌクレオチド 6 1 9 4 :

5' - ACTAGTGGCCATGCATCCGCTCAAGTTAGTATAAAAAGCAGGCTTCAG-3'

配列番号 23 : アンチセンスオリゴヌクレオチド 6 1 9 5 :

5' - AGCTCTGAAGCTTGCTTTTATACIAACTTGAGCGGATGGCATGGCCACTAGTAGCT-3'

配列番号 24 : センスオリゴヌクレオチド 6 1 9 0 :

5' - GCGTCTAGAACAGTATCGTGATGACAGAG-3'

配列番号 25 : アンチセンスオリゴヌクレオチド 6 1 9 1 :

5' - GCCAAGCTTAGCTTGCACGGATTGCGA-3'

参考文献

- Ausubel et al. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Wiley and Sons, New York.
- Behr J.P. 1993. Acc. Chem. Res. 26:274-278.
- Casadaban et al. 1983. Methods Enzymol. 100, 293-308.
- Cotten et al. E. 1993. Curr. Biol. 4:705-710.
- Giles, J.W. 1985. Am. Biotechnol., Nov./Dec.
- Hasan et al. 1987. Gene 56:145-151.
- Jain, R.K. 1987. Cancer Res. 47:3039-3051.
- Landford et al. 1986. Cell 46:575-582.
- Landy, A. 1989. Ann. Rev. Biochem. 58:913-949.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Nabel et al. 1992. Human Gene Therapy 3:399-410.
- Podhajska et al. 1985. Gene 40:163:168.
- Sadler et al. 1980. Gene, 8:279-300.
- Sinha et al. 1984. Acids Res., 12, 4539-4557.
- Stark et al. 1992. Trends Genet. 8:432-439.
- Viera et al. 1982. Gene, 19, 259-268.
- Wils et al. Biochem. Pharmacol. 48:1528-1530.

配列表

配列番号：1

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AATTGTGAAG CCTGCTTTT TATACTAACT TGAGCGG

37

配列番号：2

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AATTCCGCTC AAGTTAGTAT AAAAAAGCAG GCTTCAC

37

配列番号：3

配列の長さ：57

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GATCCGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAC

57

配列番号：4

配列の長さ：57

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GATCGTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCG
57

配列番号：5

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GAGGCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTT
25

配列番号：6

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CTGCTTTTTT ATACTAACTT G

21

配列番号：7

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CAGCTTTTTT ATACTAAGTT G

21

配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CAGCGCATTC GTAATGCGAA G

21

配列番号：9

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CTTATAATTC GTAATGCGAA G
.21

配列番号：10

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AACACTTTCT TAAATGGTT
.19

配列番号：11

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AACACTTCT TAAATTGTC
19

配列番号：12

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AAGGGATTTA AAATCCCTC
19

配列番号：13

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

ATGGTATTAA AAATCCCTC
19

配列番号：14

配列の長さ：49

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

TTCTCTGTCG GGGTGGCGGG ATTTGAACCC ACGACCTCTT CGTCCCGAA

49

配列番号：15

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CGTCGAAATA TTATAAATTA TCAGACA

27

配列番号：16

配列の長さ：66

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： c D N A

ハイポセティカル配列： N o

アンチセンス： N o

配列

```
GATCTGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAACTGC
60
AGATCT
66
```

配列番号： 1 7

配列の長さ： 6 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 2 本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： c D N A

ハイポセティカル配列： N o

アンチセンス： N o

配列

```
GATCAGATCT GCAGTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT
60
TCTTC
66
```

配列番号： 1 8

配列の長さ： 5 8

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GATCAGATCT GCAGTCTCT TCTTCTTC TTCTCTTC TTCTCTCT CTTCTTC
58

配列番号：19

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CTTCTTCTTC	TTCTCTTCT	T
21		

配列番号：20

配列の長さ：56

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AGCTTCTCGA GCTGCAGGAT ATCGAATTAG GATCCTCTAG AGCGGCCGCG AGCTCC
56

配列番号：21

配列の長さ：56

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AGCTGGAGCT CGCGGCCGCT CTAGAGGATC CGAATTGCAT ATCCCTGCAGC TCGAGA
56

配列番号：22

配列の長さ：49

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

ACTAGTGGCC ATGCATCCGC TCAAGTTAGT ATAAAAAAAGC AGGCTTCAG
49

配列番号：23

配列の長さ：57

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： c D N A

ハイポセティカル配列： N o

アンチセンス： N o

配列

AGCTCTGAAG CCTGCTTTT TATACTAAT TGAGCGGATG CATGGCCACT AGTAGCT
57

配列番号： 2 4

配列の長さ： 2 9

配列の型： 核酸

鎖の数： 2 本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： c D N A

ハイポセティカル配列： N o

アンチセンス： N o

配列

GCGTCTAGAA CAGTATCGTG ATGACAGAG
29

配列番号： 2 5

配列の長さ： 2 9

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GCCAAGCTTA

GGATTGCGA

29

GCCTTGCACT

【図1】

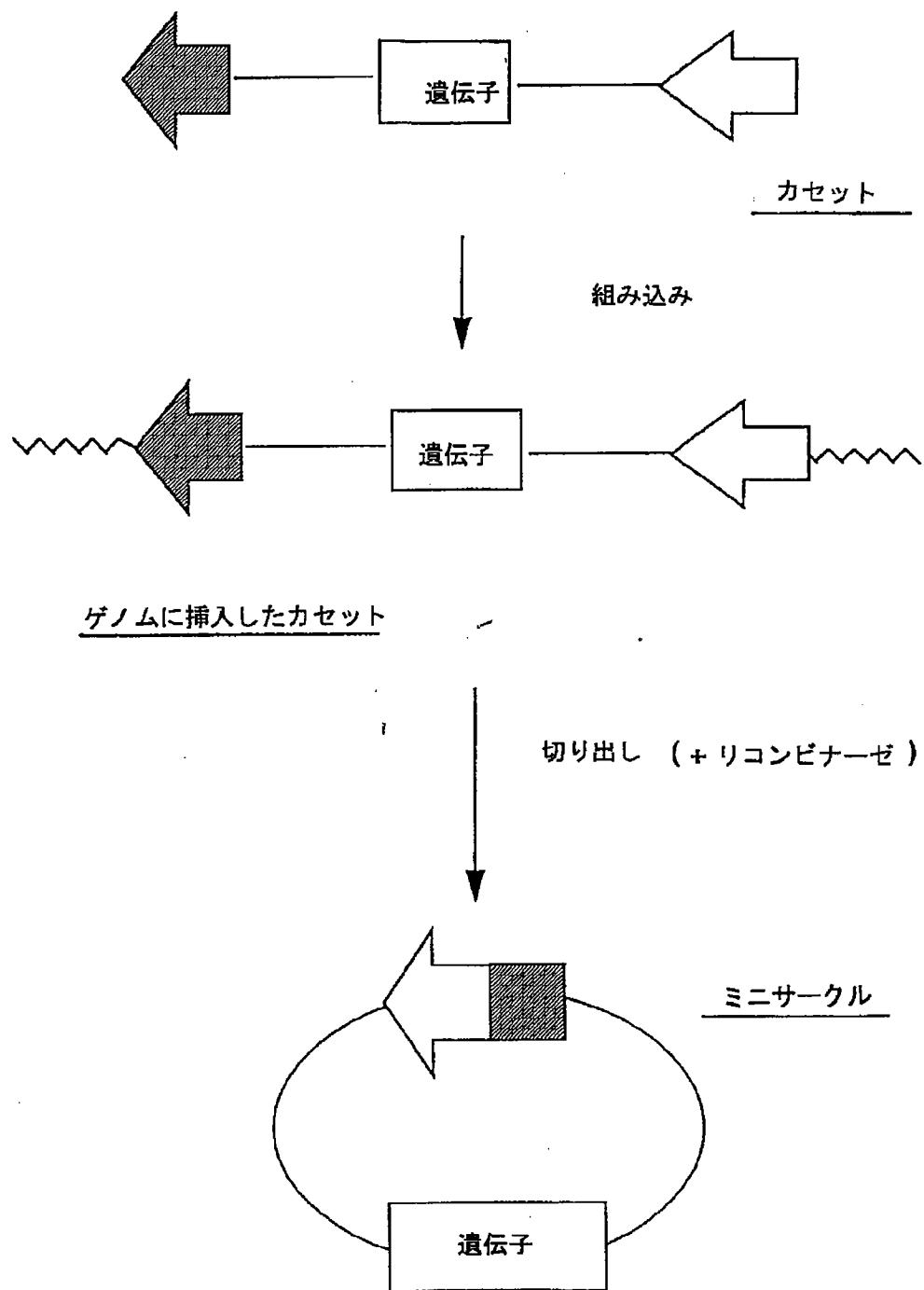


Figure 1

【図2】

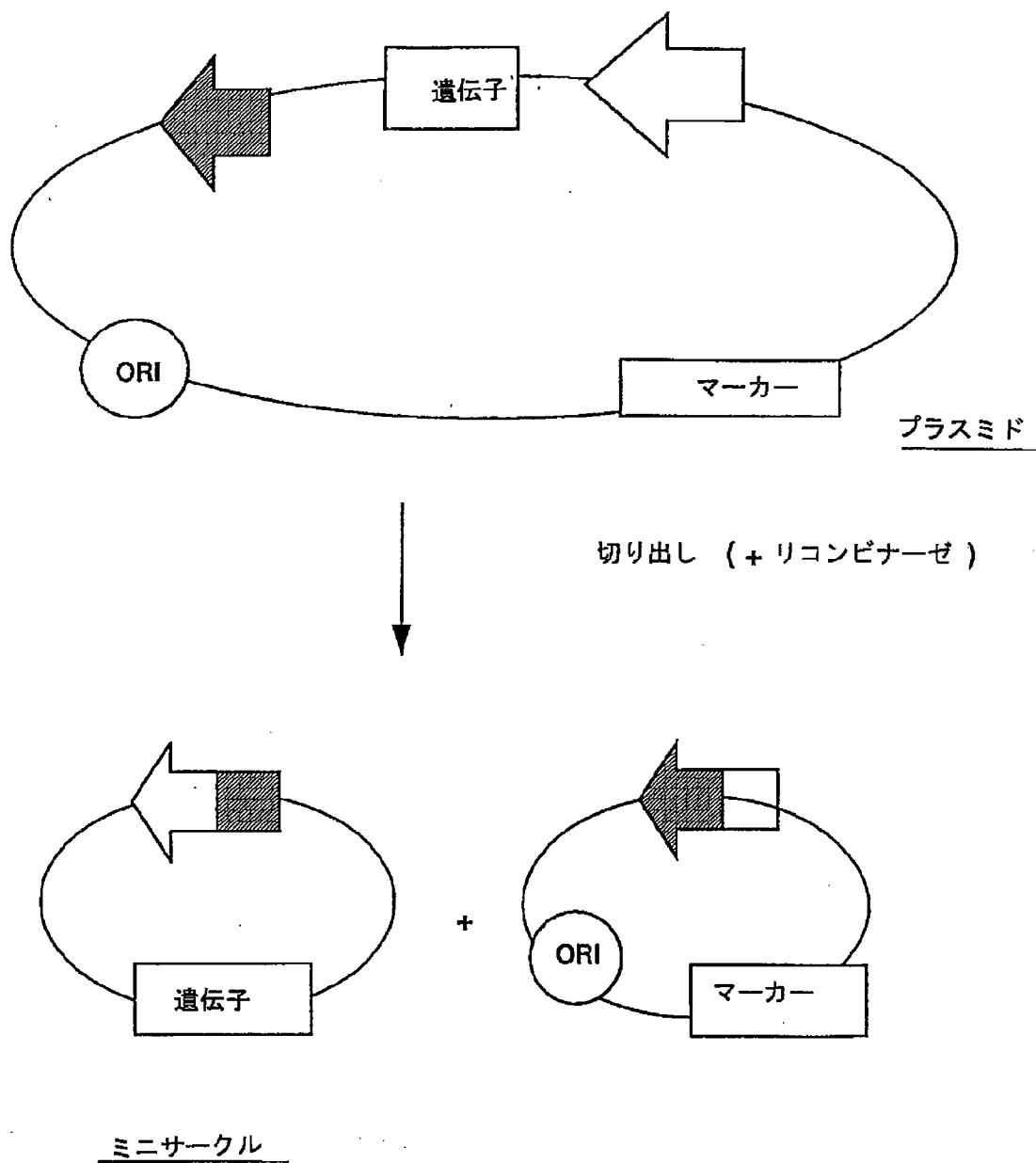
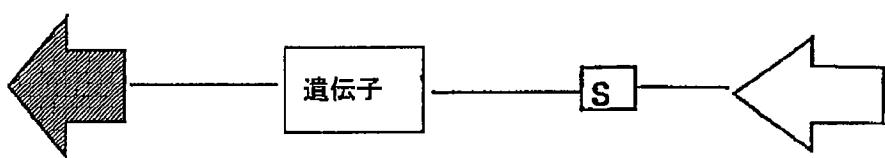
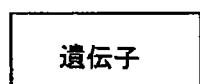
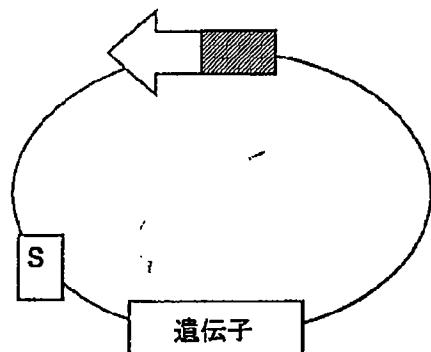


Figure 2

【図3】



切り出し (+リコンビナーゼ)



有用遺伝子



リガンド特異的配列

Figure 3

【図4】

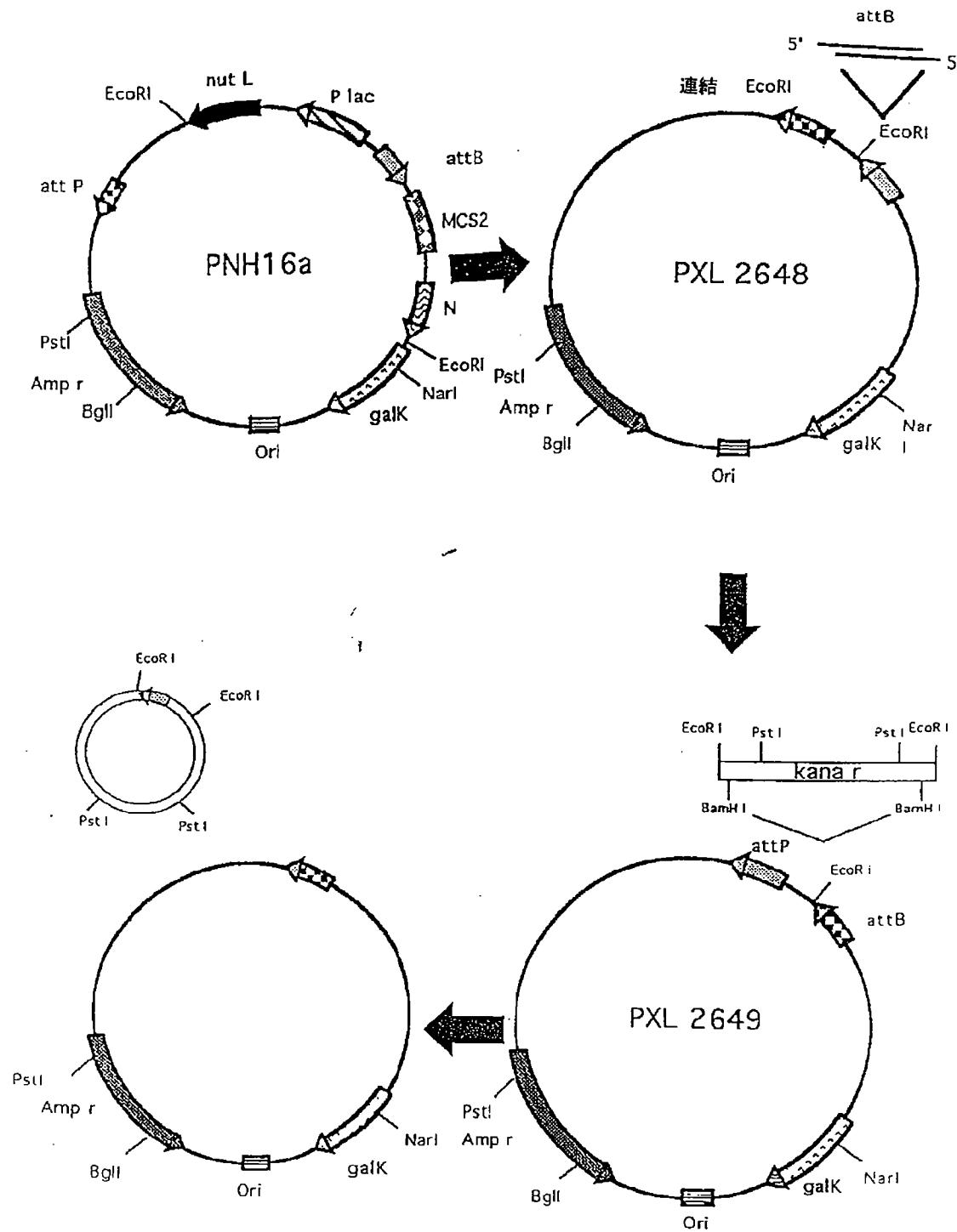


Figure 4

【図5】

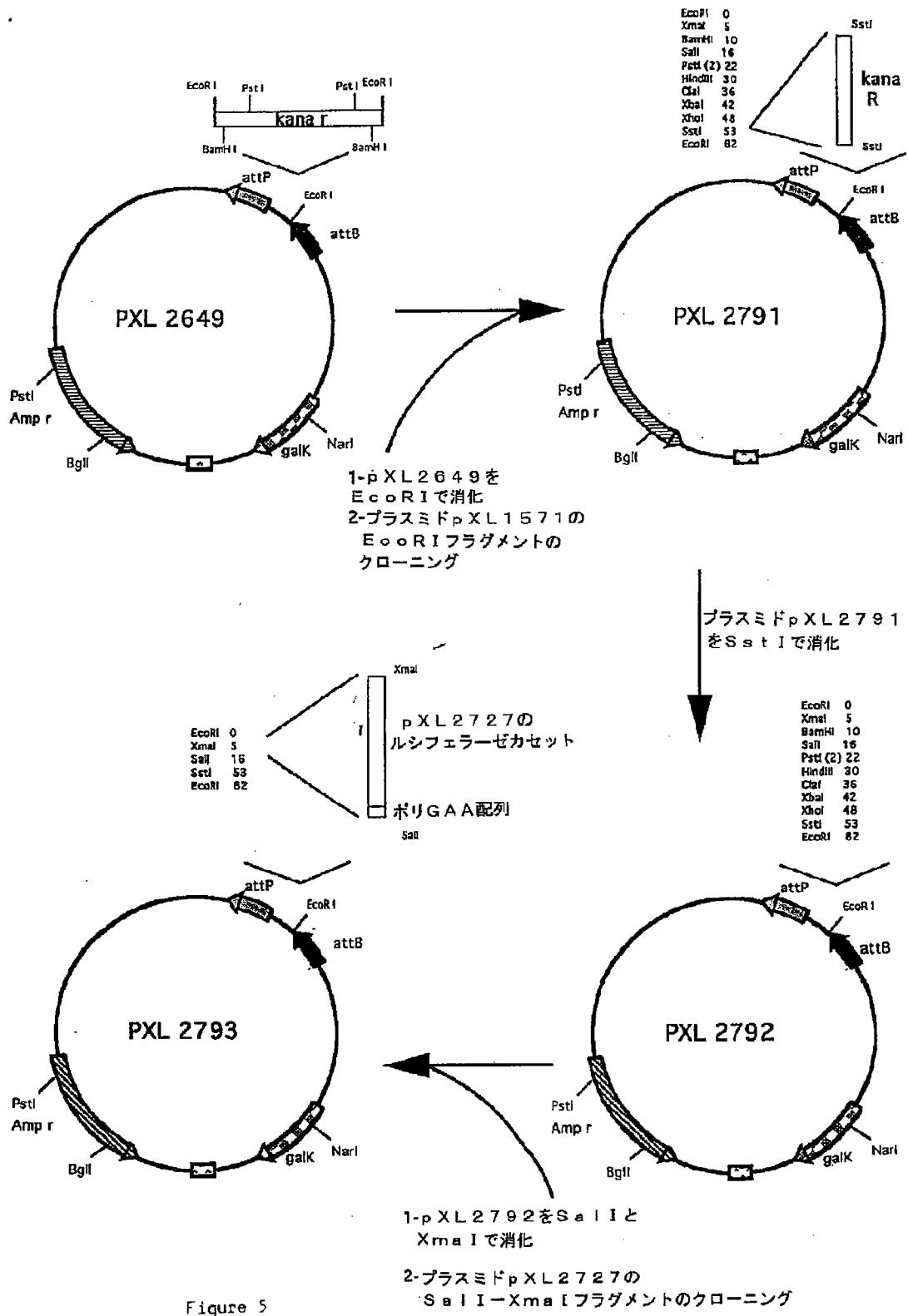


Figure 5

【図6】

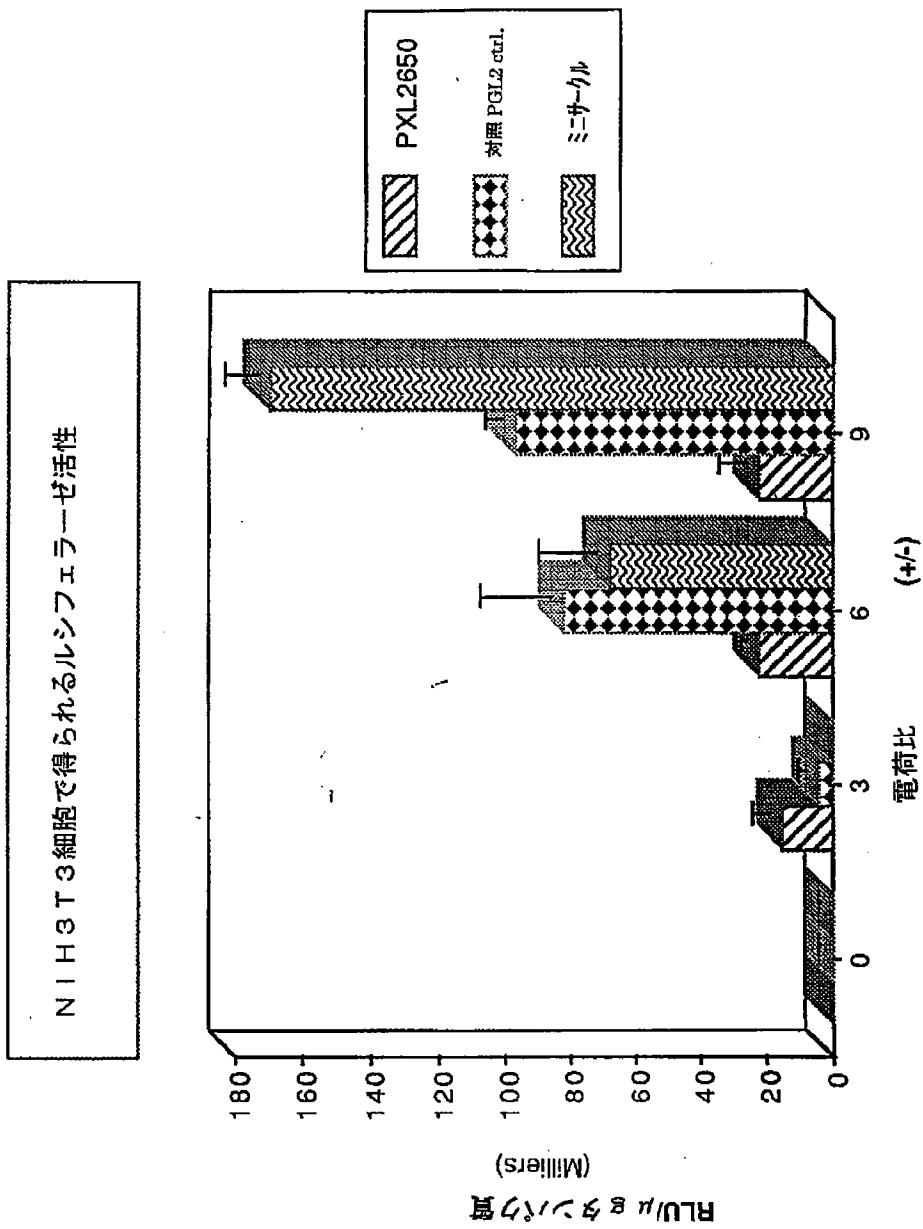


Figure 6

【図7】

- 1 ----->
- 2 ----->
- 3 ----->
- 4 ----->
- 5 ----->
- 6 ----->



Figure 7

【図8】

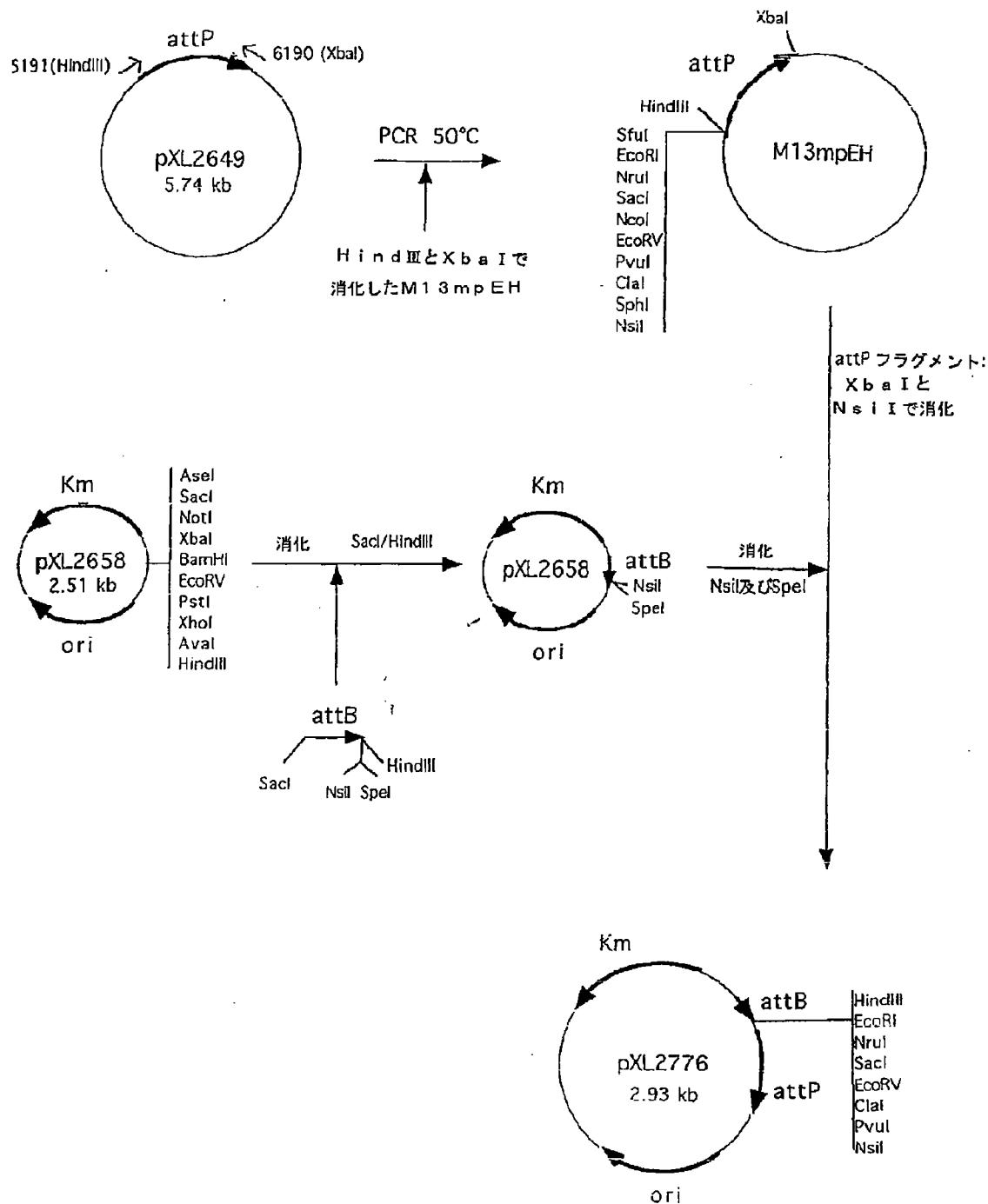
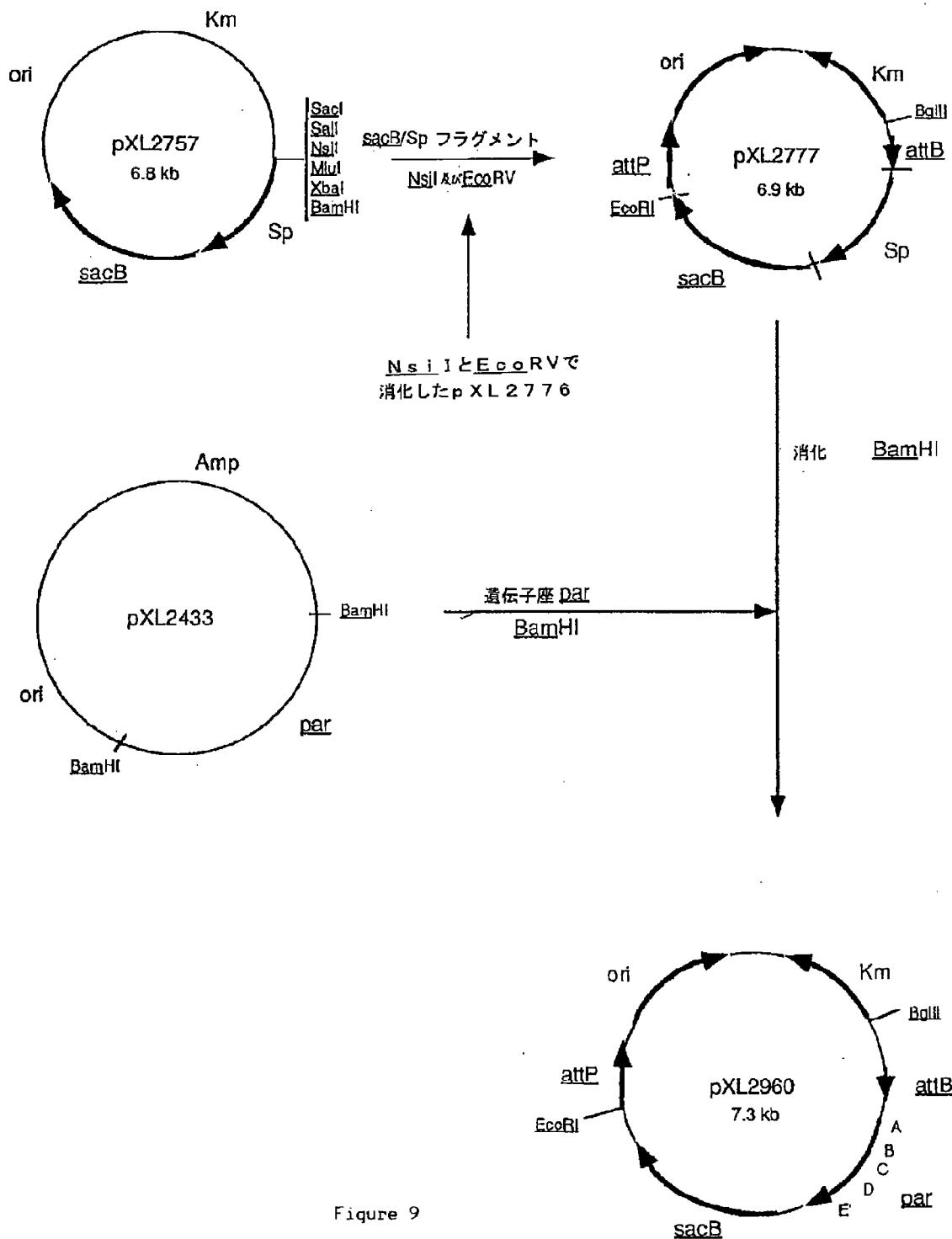


Figure 8

【図9】



【図10】

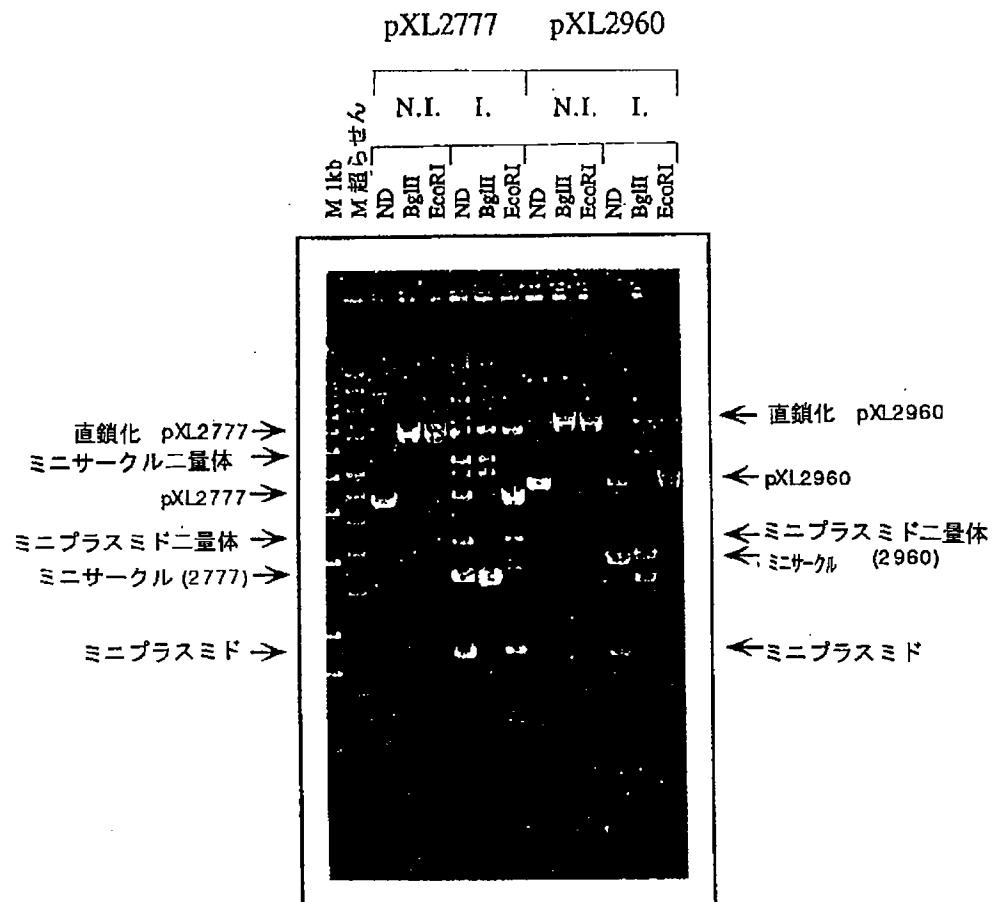


Figure 10

【図11】

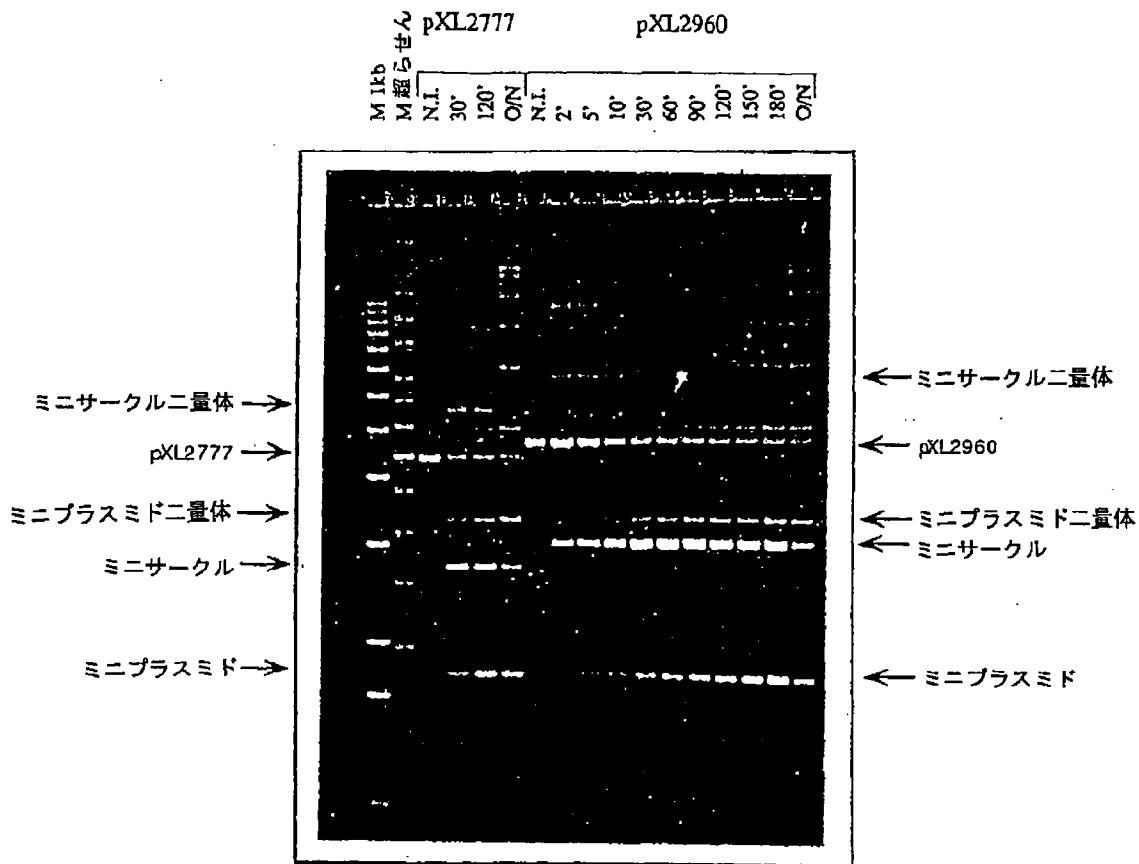


Figure 11

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PL 1/FR 96/00274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 6 C12N15/10 C12N15/70 C12N15/85 C12N5/10 C12N1/21 C12Q1/68 A61K31/70 A61K48/00 // (C12N1/21, C12R1:19)			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12Q A61K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WO,A,94 09127 (US HEALTH) 28 April 1994	1,10-12, 38,42, 43,46	
Y	see page 5, line 3 - line 14	2-7, 25-30, 47,48	
Y	see page 9, line 13 - page 15, line 8; claims 1-18; figures 1-10 ---		
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 21, 1992, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 5853-5854, XP002005118 T. TAKABATAKE ET AL.: "The use of purine-rich oligonucleotides in triplex mediated DNA isolation and generation of unidirectional deletions" see the whole document ---	2-5,26, 27,30, 47,48	
	-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents:			
'A'	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	'T'	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'E'	earlier document but published on or after the international filing date	'X'	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'L'	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	'Y'	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
'O'	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	'&'	document member of the same patent family
'P'	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report		
10 June 1996	18.06.96		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hornig, H		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00274

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 89, no. 2, 15 January 1992, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 495-498, XP002005119</p> <p>T. ITO ET AL.: "Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture" see the whole document ---</p>	2-5, 26, 27, 30, 47, 48
Y	<p>MOLECULAR MICROBIOL., vol. 12, no. 1, 1994, BLACKWELL, OXFORD, GB, pages 131-141, XP002005120</p> <p>L. EBERL ET AL.: "Analysis of the multimer resolution system encoded by the parCBA operon of broad-host-range plasmid RP4" cited in the application see the whole document ---</p>	6, 7, 25, 28, 29
A	<p>BIO/TECHNOLOGY, vol. 2, no. 12, December 1984, NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US, pages 1045-1049, XP002005121</p> <p>K. BACKMAN ET AL.: "Use of synchronous site-specific recombination in vivo to regulate gene expression" see page 1045, left-hand column, line 1 - page 1049, left-hand column, line 19 ---</p>	1-48
A	<p>US, A, 5 227 288 (BLATTNER FREDERICK R) 13 July 1993 see column 1, line 12 - column 14, line 16; claims 1-26; figure 1 ---</p>	1-48
A	<p>EP, A, 0 300 422 (DU PONT) 25 January 1989 see the whole document ---</p>	1-48
A	<p>GENE, vol. 56, 1987, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL;, page 145-151 XP002005122</p> <p>N. HASAN AND W. SZYBALSKI: "Control of cloned gene expression by promoter inversion in vivo: construction of improved vectors with a multiple cloning site and the ptac promoter" cited in the application see the whole document ---</p>	1-48
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 96/00274

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BIOL. CHEM. (1994), 269(18), 13511-21 CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, 1994, XP002005123 SU, TIN TIN ET AL: "Selective binding of Escherichia coli RNA polymerase to topoisomers of minicircles carrying the TAC16 and TAC17 promoters" see the whole document ---	1-48
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 13, no. 4, 1985, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 1193-1208, XP002005124 N. MIZUCHI AND K. MIZUCHI: "The extent of DNA sequence requirement for a functional bacterial attachment site of phage lambda" see the whole document ---	1-48
A	TRENDS IN GENETICS, vol. 8, no. 12, December 1992, ELSEVIER SCIENCE LTD., AMSTERDAM, NL, pages 432-439, XP002005125 W. M. STARK ET AL.: "Catalysis by site-specific recombinases" cited in the application see the whole document ---	1-48
A	EP,A,0 350 341 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 10 January 1990 cited in the application see the whole document ---	1-48
E	WO,A,96 05297 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;SEEBER STEFAN (DE); RUEGER RUEDIGER (DE)) 22 February 1996 see the whole document ----	1,8-24, 32-34, 37-46
T	US,A,5 401 632 (WANG RENFENG ET AL) 28 March 1995 see the whole document -----	6-9, 13-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No PCT/FR 96/00274
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9409127	28-04-94	AU-B-	5405994	09-05-94
US-A-5227288	13-07-93	NONE		
EP-A-0300422	25-01-89	AU-B- AU-B- DE-A- JP-A-	610608 1920188 3876327 1112986	23-05-91 27-01-89 14-01-93 01-05-89
EP-A-0350341	10-01-90	FR-A- AT-T- DE-D- DE-T- ES-T- JP-A-	2631634 122399 68922533 68922533 2073451 2069185	24-11-89 15-05-95 14-06-95 19-10-95 16-08-95 08-03-90
WO-A-9605297	22-02-96	DE-A-	4428402	15-02-96
US-A-5401632	28-03-95	NONE		

フロントページの続き

(51) Int.C1.⁶ 識別記号 F I
C 1 2 R 1:19)

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E,
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M
C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G
, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N,
T D, T G), A P (K E, L S, M W, S D, S Z, U
G), U A (A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J
, T M), A L, A U, B B, B G, B R, C A, C N
, C Z, E E, F I, G E, H U, I S, J P, K P,
K R, L K, L R, L T, L V, M D, M G, M K, M
N, M X, N O, N Z, P L, R O, S G, S I, S K
, T R, T T, U A, U S, U Z, V N

(72) 発明者 ダルケ, アンヌーマリー

フランス国、エフー94400・ビトリーシ
ユールーセーヌ、リュ・ジユルーラガス、
36

(72) 発明者 シエルマン, ダニエル

フランス国、エフー75645・パリ・セデツ
クス・13、リュ・ドユ・ディスク、50

(72) 発明者 ウイル, ピエール

フランス国、エフー75003・パリ、リュ・
ドウ・モンモランシー、36